

GENKONVERSION
BEI DEM B.SUBTILIS PHAGEN SPP 1

**Untersuchungen von Heteroduplices aus komplementären
DNA-Strängen mit Wildtyp- und konditional-letalem
Mutantengenotyp**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
des
Fachbereichs Biologie (23)
der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Margrit Behncke
aus Berlin

Berlin 1973



Digitized by the Internet Archive
in 2026

**GENKONVERSION
BEI DEM B.SUBTILIS PHAGEN SPP 1**

**Untersuchungen von Heteroduplices aus komplementären
DNA-Strängen mit Wildtyp- und konditional-letalem
Mutantengenotyp**

**Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
des
Fachbereichs Biologie (23)
der
Freien Universität Berlin**

**vorgelegt von
Margrit Behncke
aus Berlin**

Berlin 1973



1. Referent: Professor Dr. T.A. Trautner
2. Referent: Professor Dr. E.R. Lochmann

Tag der Promotion: 20. Juli 1973

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik in Berlin-Dahlem angefertigt.

Herrn Professor Dr. T.A. Trautner danke ich für die hilfreichen Anleitungen und Anregungen bei der Durchführung der Arbeit und bei der Vorbereitung des Manuskripts. Ebenso möchte ich allen Mitgliedern der Abteilung Trautner für ihr Interesse danken.

1.	Einleitung	1
2.	Material und Methoden	4
2.1	Medien und Platten	4
2.2	Antiserum	4
2.3	Bakterium	5
2.4	Bakteriophagen	5
2.5	Mutagenese	6
2.6	Isolierung der amber-Mutanten	6
2.7	Komplementation	8
2.8	Phagenkreuzungen	9
2.9	Präparation der Phagen-DNA	11
2.10	Präparation von ribosomaler RNA	13
2.11	Einzelstrangtrennung	13
2.12	Renaturierung der DNA	16
2.13	Transfektion	18
2.14	DNA-Kreuzungen	20
3.	Ergebnisse	
3.1	Isolierung der amber-Mutanten	21
3.2	Charakterisierung der amber-Mutanten	21
3.21	Komplementation	21
3.22	Rekombination	25
3.3	Konversion	50
3.31	Allgemeine Beschreibung der Versuchsergebnisse	50
3.32	Konversionsrichtung	68
3.33	Verteilung des Konversionsmusters über die Genkarte	75
3.34	Abhängigkeit der Mischwürfe von der Lage der Mutanten auf der Genkarte	75

4.	Diskussion	82
4.1	Komplementation	82
4.2	Konversion	88
4.31	Verteilung der Konversionsrichtung	88
4.32	"Clustering"	89
4.33	Mechanismus	90
4.331	Beziehung der Konversion zur DNA-Replikation	90
4.332	Molekularmechanismus	92
5.	Ausblick	101
6.	Zusammenfassung	104
7.	Literatur	106
	Lebenslauf	I

Einleitung

In doppelsträngiger DNA sind die Basensequenzen der beiden Einzelstränge komplementär angeordnet. Gelegentlich werden in Folge von Mutagenese oder von Fehlern bei der DNA-Replikation einzelne Basen eines Einzelstranges derart verändert, daß nicht passende Basenpaare auftreten. Auch während der Rekombination, bei der komplementäre Stränge von genetisch verschiedenen Eltern in Interaktionen treten, können nicht komplementäre Basenpaare entstehen. DNA-Moleküle, die eine Region enthalten, in der ein oder mehrere Basenpaare nicht komplementär sind, werden als Heteroduplexmoleküle bezeichnet (Levinthal, 1959).

Heteroduplex-DNA manifestiert sich biologisch in internen Heterozygoten, die bei Phagen-Kreuzungen mit einer Häufigkeit zwischen 0,1 - 2 % in der Nachkommenschaft bei T 2 (Hershey und Chase, 1951), bei T 1 (Trautner, 1958), bei λ (Kellenberger et al., 1962) und bei T 4 (Womack, 1963) beobachtet wurden. Heteroduplexmoleküle sind instabil. Sie segregieren im Zuge ihrer Replikation in zwei homozygote DNA-Moleküle mit verschiedener genetischer Information. Plaques, die auf Heterozygoteninfektion zurückzuführen sind, können morphologisch durch das gleichzeitige Auftreten zweier Plaquetyparten erkannt werden.

Heteroduplex-Regionen können auch vor der DNA-Replikation durch einen "Reparaturmechanismus" eliminiert werden. Hierbei entsteht ein Homoduplexmolekül. Die genetische Information eines Stranges wird zugunsten des Genotyps des komplementären Stranges zerstört. Dieser Ablauf wird "Konversion" genannt (Holliday, 1968; Whitehouse, 1970). Es wurde postuliert, daß diese Reparatur von Hetero- zu Homoduplexen für hohe negative Interferenz bei Phagen, z.B. für T 4 (Chase und Doermann, 1958), für λ (Amati und Meselson, 1965) und bei Pilzen für "Gen"-Konversion, z.B. für *Saccharomyces* (Lindgren, 1953), *Sordaria* (Olive, 1959), *Ascobolus* (Rossignol, 1969), *Neurospora* (Klingmüller, 1973) und für "Map expansion", z.B. bei *Aspergillus*, *Schizosaccharomyces* und *Ascobolus* (Holliday, 1964) verantwortlich ist.

Konversion als Folge von Elimination von Fehlpaarungen in Heteroduplexregionen war zunächst nur eine Hypothese, da es nicht möglich ist, reine Populationen biologisch aktiver Heteroduplexmoleküle herzustellen. Es wurden jedoch im Laufe der Zeit Systeme bekannt, die Strangtrennung und Transfektion erlauben. So wurden nach quantitativer Trennung von DNA in ihre komplementären Einzelstränge und anschließender Renaturierung von Einzelsträngen verschiedener Genotypen Heteroduplexmoleküle hergestellt, die nach Infektion vorbehandelter Wirtsbakterien (= Transfektion) biologisch untersucht werden konnten. Diese Technik wurde zuerst für den Phagen λ (Doerfler und Hogness, 1968) zur Bestimmung des codogenen Stranges bei der Transkription eines λ -Gens benutzt. Dieselbe Methode der Herstellung von transfizierender Heteroduplex-moleküle wurde für den Phagen SPP1 (Spatz und Trautner, 1970) und für den Phagen ϕ X 174 (Baas und Jantz, 1972) angewandt, um unter anderen Aussagen über den Mechanismus der Replikation zu gewinnen. Für alle drei verschiedenen Phagen wurde an transfizierter Heteroduplex-DNA in beträchtlichem Ausmaß Zerstörung von Hetero- zu Homoduplices beobachtet.

Ebenso wurden bei Pneumococcus in transformierender Heteroduplex-DNA Markerpaare in trans-Konfiguration entgegen ihrer erwarteten Segregation in Einzelmarker zu einer cis-Konfiguration auf der DNA umgewandelt (Roger, 1972).

Ausgehend von den untersuchten Heteroduplexmolekülen für Plaquetypmutanten des Phagen SPP1 (Spatz und Trautner, 1970) werden in dieser Arbeit die Transfektionsexperimente auf Heteroduplexmoleküle für amber- und temperatur-sensitive Mutanten von SPP1 erweitert. Zunächst sollten die isolierten amber-Mutanten in die Genkarte von SPP1 (Spatz und Trautner, 1970) eingeordnet werden. Erwartungsgemäß sollten amber-Mutanten über das gesamte Genom verteilt sein. Sodann sollte das Konversionsverhalten von Heteroduplexmolekülen für amber- und temperatur-sensitive Mutanten bestimmt werden und weiterhin, ob sich aus der Erweiterung der Zahl der untersuchten Heteroduplexmoleküle generelle Gesetzmäßigkeiten zur Konversion ableiten lassen.

Amber-Mutanten, die als Heteroduplex untersucht werden sollten, wurden isoliert und durch Komplementation sowie durch Bestimmung der Prozentsätze an Wildtyprekombinanten aus Zweifaktorkreuzungen mit anderen Mutanten auf der Genkarte von SPP1 lokalisiert. Anschließend wurden nach Transfektion von Heteroduplex-DNA für amber- und temperatur-sensitive Mutanten die Phagennachkommen analysiert.

Die genetische Analyse der Heteroduplexmoleküle zeigte bei der Konversion für die meisten amber- und temperatur-sensitiven Mutanten eindeutige Strangbevorzugung entsprechend dem konventionellen Konversionsmuster von Punktmutanten (Spatz und Trautner, 1970). Einige der amber-Mutanten verhielten sich abweichend von diesem Konversionsmuster. Sie zeigten Markereffekte derart, daß unabhängig von der Orientierung der Allele in Hinblick auf die Stränge fast ausschließlich Konversion zum Genotyp der Mutante erfolgte. Weiterhin wurde die Korrelation zwischen der Position der Mutante auf der erweiterten Genkarte und der Verteilung des Konversionsmusters über der Genkarte untersucht. Es ließen sich angrenzende Regionen des SPP1-Genoms beschreiben, in denen Konversion entweder fast ausschließlich zum Genotyp des schweren oder des leichten Stranges in einem Heteroduplexmolekül erfolgte. Außerdem wurde aus der größeren Gesamtzahl von untersuchten Mutanten die Abhängigkeit der Konversion von der Replikationsrichtung überprüft.

Wie für Plaquetypmutanten von SPP1 (Spatz und Trautner, 1970) und für temperatur-sensitive Mutanten für Ø X 174 (Baas und Jantz, 1972) konnte auch für amber- und temperatur-sensitive Mutanten von SPP1 eine Korrelation zwischen der Effizienz der Konversion und der Position der Mutante auf der Genkarte bestätigt werden (ausgenommen eine amber-Mutante, die einen Markereffekt in bezug auf die Korrelation zwischen Konversionshäufigkeit und Position auf der Genkarte zeigte).

Aus dem Ausmaß und der Spezifität der Konversion kann auf eine Heteroduplex-Korrektur als Folge von Heteroduplex-Erkennung entsprechend dem Holliday-Whitehouse-Modell geschlossen werden (Holliday, 1968; Whitehouse, 1970).

2. Material und Methoden

2.1 Medien und Platten

- a) Tryptone-Yeast-Medium (TY) (Biswal et al., 1967) wurde für Phagen-Lysate, Bakterienkulturen und Verdünnungen verwendet.

Neben TY als Wachstumsmedium wurde PS (Riva et al., 1968) leicht verändert benutzt. Es enthielt: 6 g Pepton, 3 g Hefeextrakt, 4 g Caseinhydrolysat (säurehydrolysiert) in 1 000 ml Aqua bidest. gelöst.

- b) Wachstumsmedien für kompetente Zellen (Rottländer und Trautner, 1970).

- c) DNA-Verdünnungsmedium (Rottländer und Trautner, 1970).

- d) TBT-Medium (Biswal et al., 1967).

- e) Folgende Platten wurden benutzt:

LTT (Spatz und Trautner, 1970)

TY (Rottländer und Trautner, 1970)

Minimalmedium M III (Spizizen, 1958)

NB (Spatz und Trautner, 1971) und

LTT dp. NaCl, die auf 1 000 ml Aqua bidest. 10 g NaCl,

10 g Bacto-Tryptone (Difco), 15 g Bacto-Agar (Difco)

und 10^{-4} M MnSO_4 enthielten.

2.2 Antiserum

Als Anti-SPP1-Serum wurde ein Kaninchenserum ($K = 100 \text{ min}^{-1}$) benutzt.

2.3 Bakterien

Es wurden *B. subtilis*-Mutanten verwendet, die in der Tabelle 1 aufgeführt sind. MCB Su 3+ wurde durch Transformation von kompetenten MCB-Zellen (Genotyp: su^- , trp^- , leu^+) mit DNA des Stammes Su 3+ (Georgopoulos, 1969; Genotyp: su^+ , trp^+ , leu^-) erhalten. Hierzu wurden auf Minimalmedium M III-Platten trp^+ -Transformanden mit einer Häufigkeit von ca. $5 \cdot 10^{-2} \%$ selektioniert. Nach Replikaplattierung auf Platten mit ca. 10^5 amber-Phagen wurden unter ca. 10^3 trp^+ -Kolonien einzelne lysierte Kolonien als su^+ -Transformanden erkannt und von der Originalplatte isoliert. Die Häufigkeit für Co-Transformation der Genorte trp^+ und su^+ betrug demnach ca. $10^{-5} \%$. Die Gewinnung des adsorptionsresistenten Stammes MCB Su 3+/SPP1 erfolgte durch Selektion mit einem großen Überschuß von SPP1-Phagen als Spontanmutante.

Tabelle 1: Bakterienstämme

Bezeichnung	Referenz

168 - 2	Spatz und Trautner, 1971
MCB	Spatz und Trautner, 1971
MCB/SPP1	Spatz und Trautner, 1971
Su 3+	Georgopoulos, 1969
MCB Su 3+	durch Transformation aus MCB entstanden, siehe Text
908 - 13	Jürgens, unveröffentlicht

2.4 Bakteriophagen

Der Wildtyp von SPP1 (Riva et al., 1968) und dessen folgende Mutanten wurden benutzt:

- 1) Temperatursensitive Mutanten (ts) G6, 3, 1, 6, 34, 58, 35, 50, 40, 31 (Spatz und Trautner, 1971).

- 2) Plaquetypmutanten 515, 516, L 61, 111, 281, NOH 3 (Spatz und Trautner, 1971). Die temperatur-sensitiven- und Plaquetypmutanten stammen aus der Sammlung unseres Instituts.
- 3) Suppressor sensitive amber-Mutanten (am). Eine Charakterisierung dieser Mutanten wird in dem Abschnitt über ihre Isolierung gegeben.

2.5 Mutagenese

Amber-Mutanten wurden nach Mutagenese von Wildtypphagen mit Hydroxylamin (Tessman, 1968) isoliert. Eine Phagensuspension (in TY) wurde in die Mutageneselösung aus 0,4 M Hydroxylamin, 0,05 M Na-Phosphat-Puffer, 10^{-2} M $MgCl_2$, 10^{-3} M EDTA bei pH 6,0 auf das 10 fache verdünnt und bei 37° für 20 - 50 h inkubiert. Die Zahl der Überlebenden betrug nach 30 h Mutagenese ca. 0,1 - 1,0 %, nach 50 h Mutagenese ca. 0,01 %. Die mutagene Behandlung wurde durch 1 000 fache Verdünnung in TY bei 0° beendet. Anschließend wurde Hydroxylamin durch Dialyse gegen TY für 3 x 2 h bei 4° entfernt. Abbildung 1 gibt die Phageninaktivierung als Funktion der Einwirkungszeit von Hydroxylamin wieder. Hydroxylamin führte in Abhängigkeit von der Zeit zu einer Zunahme an Plaquetypmutanten. Abbildung 1 zeigt, daß der Prozentsatz an Plaquetypmutanten zum Zeitpunkt 0 kleiner als 0,1 % war; nach 50 h Mutagenese betrug der Anteil an Plaquetypmutanten unter den Überlebenden ca. 10 %.

2.6 Isolierung der amber-Mutanten

Um amber-Mutanten isolieren zu können, die auf Su 3+, jedoch nicht auf MCB (Genotyp: su⁻) wachsen, wurden 30 h mutagenisierte Phagen mit Su 3+ auf NB-Platten inkubiert. Wenn Plaques, die von den Ausgangsplatten abgeimpft wurden, nach Replikaplattierung auf Su 3+ und MCB den su⁻-Bakteriumstamm MCB nicht lysierten, so hatten diese die erwarteten Eigenschaften von amber-Mutanten. Einige amber-Mutanten waren zusätzlich durch ihre kleineren Plaques von dem Wildtyp zu unterscheiden. Es wurden nur

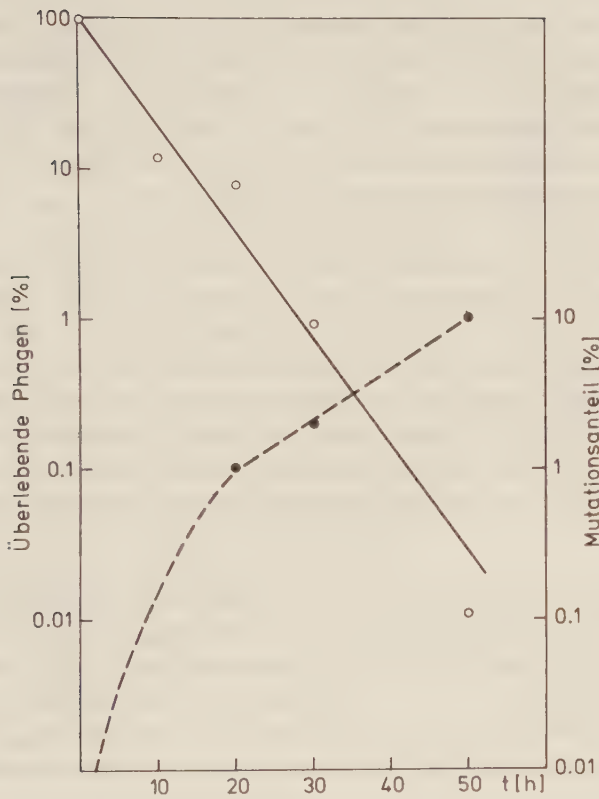


Abbildung 1: Hydroxylamin-Mutagenese für SPP1-Phagen. Der Prozentsatz an überlebenden Phagen ist gegen die Einwirkungsdauer von Hydroxylamin aufgetragen (○—○). Der Prozentsatz an Plaquetypmutanten unter den Überlebenden ist ebenfalls dargestellt (●—●). Zum Zeitpunkt 0 ist der Mutantenprozentsatz kleiner als 0,1 %.

solche Mutanten zur weiteren Analyse ausgewählt, deren Plattierungseffizienz auf einem su^- -Bakteriumstamm (MCB) im Vergleich zu einem su^+ -Bakteriumstamm (Su 3+ bzw. MCB Su 3+) höchstens 10^{-4} war. Für den Wildtyp betrug das Verhältnis der e. o. p. auf diesen Bakterienstämmen 1 - 4. Die geringe Wachstumsfähigkeit von amber-Mutanten auf einem su^- -Bakteriumstamm konnte entweder durch Revertanten oder durch ein begrenztes Wachstumsverhalten ("Leakiness") bedingt sein.

Obwohl nach 30 h Mutagenese unter den Überlebenden der Anteil an Plaquetypmutanten 2 % betrug, lag der Anteil an amber-Mutanten überraschenderweise nur bei 0,5 %. Wahrscheinlich ist die geringere Häufigkeit, mit der amber-Mutanten gegenüber Plaquetypmutanten gefunden werden, auf niedrige Vermehrungsrate und hohe Leakiness einiger amber-Mutanten zurückzuführen. Ebenfalls könnte spezifische Korrektur von amber-Heteroduplexmolekülen, die als erstes Produkt der Mutagenese entstehen, zum Wildtyp die niedrigen Mutationshäufigkeiten der amber-Mutanten verursachen.

Es wurden von den 25 isolierten amber-Mutanten Lysate hergestellt. Ein über Nacht gewachsenes Einzelplaque einer amber-Mutante wurde in 2 ml TY suspendiert. Es wurde 20 ml wachsende Bakterienkultur von MCB Su 3+ bei einer Konzentration von ca. $5 \cdot 10^8$ Zellen $\cdot ml^{-1}$ mit dem abgeimpften Plaque infiziert. Nach 16 h Inkubation bei 37° hatte dieses Lysat eine Konzentration zwischen $10^9 - 10^{10}$ Phagen $\cdot ml^{-1}$. Der Revertantensatz lag zwischen $10^{-3} - 10^{-2}$ %.

2.7 Komplementation

Um festzustellen, wie vielen funktionellen Einheiten (Cistronen) die Mutanten zuzuordnen sind, wurden Komplementationsversuche angestellt.

Ob Mutanten komplementierbar sind oder nicht, hängt unter anderem von dem Aktivitätsniveau zwischen Mutanten- und Wildtypallel ab. Mutanten, die eine hohe Reversionsrate haben oder "leaky" sind, geben nicht das tatsächliche Ausmaß der Komplementation der Mutante wieder. Zur Kontrolle der "leakiness" und des unterschiedlichen Reversionsverhaltens verschiedener Mutanten wurden die Mutanten in verschiedenen Konzentrationen im

Spot-Test miteinander getestet. Eine Mutante wurde in zwei verschiedenen Konzentrationen 10^6 und 10^7 Partikel $\cdot \text{ml}^{-1}$ zusammen mit Plattierungsbakterien MCB (Genotyp: su^-) auf je eine Platte gegeben. Je ein Tropfen einer anderen Mutante wurde in zwei verschiedenen Konzentrationen 10^6 , 10^5 Phagen $\cdot \text{ml}^{-1}$ bzw. drei verschiedenen Konzentrationen 10^7 , 10^6 , 10^5 Phagen $\cdot \text{ml}^{-1}$ zu der auf der Platte bereits ausgestrichenen Mutante zugegeben. Jede Mutante wurde parallel zum Komplementationstest ebenfalls im Tropftest auf ihren Revertantensatz bzw. leakiness getestet. Inkubation erfolgte bei 37° , in einem Komplementationstest einer amber-Mutante gegen temperatur-sensitive-Mutanten bei 46° .

Wenn auf der mit einer infizierten Mutante Platte in einem Tropfen, der eine andere Mutante enthielt, Lyse auftrat, werden die getesteten Mutanten verschiedenen Komplementationsgruppen zugeordnet; wenige Plaques (Revertanten oder Rekombinanten) oder keine Lyse bedeuteten dagegen, daß beide Mutanten in einer Komplementationsgruppe lagen.

2.8 Phagenkreuzungen

Zur Lokalisation der isolierten amber-Mutanten wurden die Prozentsätze der Wildtyprekombinanten in Zweifaktorkreuzungen in Kombinationen zwischen amber- und bereits kartierten Mutanten bestimmt. Zweifaktorkreuzungen geben den relativen Abstand der Genorte voneinander an. Für einige amber-Mutanten wurden neben Zwei- auch Dreifaktorkreuzungen durchgeführt, um eine eindeutige Genanordnung zu erhalten.

Bei einer Kreuzung wurde eine wachsende Bakterienkultur von MCB Su 3+ bei einer optischen Dichte $(\text{OD})_{550} = 0,5$ (entspricht ca. 10^8 Zellen $\cdot \text{ml}^{-1}$) mit zwei Phagenmutanten von einem Titer $1 \cdot 10^9$ Partikel $\cdot \text{ml}^{-1}$ pro Phagentyp infiziert. Nach 15 min Inkubation bei 37° bzw. 30° (ts) waren 25 - 50 % der Phagen adsorbiert. Die Infektionsmultiplizität (m. o. i.) lag demnach zwischen 2,5 und 5 pro Phagentyp. Die nicht adsorbierten Phagen wurden mit SPPI-Antiserum (Endverdünnung 1/100) für 5 min bei 37° bzw. 30° (ts) inaktiviert. Das Kreuzungsgemisch wurde dann in TY 1 : 1000 verdünnt und bis zu seiner Lyse für 3 h bei 37° bzw. 30° (ts) inkubiert.

Nach geeigneter Verdünnung wurde das Kreuzungslisat auf NB-Platten plattiert. Die Gesamtzahl an infizierten Zellen wurde unter nicht selektiven Plattierungsbedingungen auf MCB Su 3+ und der Anteil der Wildtyprekombinanten unter selektiven Plattierungsbedingungen auf MCB bestimmt. In Kreuzungen zwischen amber- und temperatur-sensitiven Mutanten betrug die Inkubationstemperatur unter nicht selektiven Plattierungsbedingungen 30°, unter selektiven Plattierungsbedingungen 46°. Plaquetypmutanten ließen sich auf Su 3+ in ihrer Morphologie vom Wildtyp unterscheiden.

Nach 3 h Lyse betrug die Wurgröße der Phagen aus infizierten Zellen je nach Kreuzung 5 - 200 (Tabelle 8a). Diese Schwankungen in der Wurgröße waren auf die unterschiedliche Erkennbarkeit und die verschiedene Wurgröße der parentalen Mutanten zurückzuführen. Parallel zu den Kreuzungen wurde in Einzelinfektionen der Revertantensatz der verwendeten Parental-typen unter Kreuzungsbedingungen bestimmt. Gleichzeitig wurde für jeden Kreuzungsansatz die relative e. o. p. des Wildtyps unter selektiven und nicht selektiven Plattierungsbedingungen ermittelt. Die gemessene relative e. o. p. ist unter Kreuzungsbedingungen für den Wildtyp und den Mutantengenotyp in der Tabelle 2 wiedergegeben. Die beobachteten Rekombinationshäufigkeiten des Wildtyps wurden auf eine e. o. p. 1.0 korrigiert.

Tabelle 2: Relative e. o. p. unter verschiedenen Kreuzungsbedingungen

Genotyp der Phagen	Selektive Plattierungsbedingungen		Nicht selektive Plattierungsbedingungen		relative e. o. p.
	Bakt.	Temp.	Bakt.	Temp.	
Wildtyp	168-2	37°	MCB Su3+	37°	1 - 3
	168-2	46°	MCB Su3+	30°	1 - 3
Amber-Mutante	MCB oder 168-2	37°	MCB Su3+ oder Su3+	37°	10 ⁻⁴ -10 ⁻⁵
	168-2	46°	MCB Su3+	30°	10 ⁻⁵ -10 ⁻⁷
Temperatur-sensitive Mutante					

Der Anteil von Wildtyprekombinanten wurde aus mindestens 100 Plaques ermittelt (Tabl. 8a). Aus jeder Gruppe der amber-Mutanten (die Kreuzungsdaten sind in den Tabellen 5 - 11 wiedergegeben) wurde ein Mutantenpaar ausgewählt, für das Phagenkreuzungen mehr als einmal ausgeführt wurden. Die Reproduzierbarkeit der Wildtypprozentsätze betrug $\pm 30\%$. Diese Schwankungen lassen sich mit der kleinen Wurfgröße und der Erkennbarkeit einiger Mutanten sowie mit dem unterschiedlichen Verhältnis des Wildtyps unter selektiven und nicht selektiven Platingbedingungen in verschiedenen Kreuzungsansätzen erklären.

Zur Kontrolle der Einordnung von amber-Mutanten in die Genkarte der temperatur-sensitiven- und Plaquetypmutanten von SPP1 erfolgte parallel zu den Kreuzungen zwischen temperatur-sensitiven- und amber-Mutanten eine Kreuzung eines temperatur-sensitiven Mutantenpaares (ts 3 X ts 40 oder ts 40 X ts 31) mit gut reproduzierbaren Wildtyprekombinantenprozent-sätzen. Es sollten damit die Kreuzungsbedingungen standardisiert werden.

In allen Kreuzungsexperimenten wurde nur die Häufigkeit der Wildtyprekombinanten bestimmt. Die reziproken Doppelmutanten waren nicht durch ihre Plaquemorphologie von Einzelmutanten zu unterscheiden. In einem Falle wurde zur Herstellung der Doppelmutante am118 am119 aus der Phagenkreuzung am118 X am119 einzelne Plaques abgeimpft. Da diese im Komplementationstest mit beiden Parentaltypen nicht komplementierten, konnten sie als Doppelmutanten identifiziert und isoliert werden. Die Häufigkeit dieser Doppelmutanten entsprach der Häufigkeit der Wildtyprekombinanten.

2.9 Präparation der Phagen-DNA

Für die Herstellung von hochkonzentrierter Phagensuspension zur DNA-Isolierung wurden für amber-Mutanten Phagenlysate von 1 l Gesamtvolumen hergestellt. 1 000 ml MCB Su 3+ Bakterienkultur mit einer Konzentration von ca. $5 \cdot 10^8$ Zellen $\cdot$ ml⁻¹ wurden auf fünf 1 l - Erlenmeyerkolben in 200 ml Ansätzen verteilt und mit Phagen einer Infektionsmultiplizität von 0,1 - 1,0 Phagen infiziert. Unter den gleichen Inkubationsbedingungen wie sie für die Herstellung des 20 ml - Phagenlysats beschrieben wurden, er-

reichte die Phagenkonzentration zwischen 10^9 - 10^{10} infektiöse Partikel $\cdot \text{ml}^{-1}$. Der Revertantensatz lag zwischen 10^{-2} - 10^{-5} .

Für temperatur-sensitive Mutanten wurde dagegen bereits mit einem 200 ml - Lysatansatz bei 30° Inkubation und MCB als Wachstumsbakterium eine Konzentration von 10^{10} infektiösen Partikeln $\cdot \text{ml}^{-1}$ erhalten. Der Revertantenanteil betrug ca. 10^{-5} .

Nach Abtrennung der Bakterienzellen bzw. Zellbruchstücke durch Zentrifugation für 20 min bei $1,6 \cdot 10^4$ g wurde der Phagenüberstand nach erneuter Zentrifugation für 180 min bei $2,7 \cdot 10^4$ g auf ein Volumen von 5 - 10 ml eingeeengt. Anschließend wurden die Phagen in einem CsCl-Einstufengradienten ($P_1 = 1,7 \text{ g ml}^{-1}$; $P_2 = 1,3 \text{ g ml}^{-1}$) (Biswal et al., 1967, für SP 50 ausführlich beschrieben) gereinigt. Nach Zentrifugation für 120 min bei $6,4 \cdot 10^4$ g bandeten die Phagen an der Grenzfläche der CsCl-Lösungen verschiedener Dichte. Die Bande der gereinigten Phagen wurden gesammelt. CsCl wurde durch Dialyse gegen TBT entfernt. Die gereinigten Phagen hatten eine Konzentration von 10^{12} Partikel $\cdot \text{ml}^{-1}$. Da die DNA-Menge, die man hieraus erhält, höher war als erwartet, ist anzunehmen, daß Phagenlysate neben infektiösen auch nicht infektiöse Partikel, die eine zusätzliche Fraktion von DNA liefern, enthalten.

Phagen-DNA wurde mit Phenol (gesättigt mit 0,1 M Tris, pH 8) bei 4° extrahiert (Biswal, et al., 1967, für SP 50 ausführlich beschrieben). Anschließend wurde Phenol durch Dialyse gegen SSC entfernt. Die DNA-Konzentration wurde spektrophotometrisch bei 260 nm ermittelt, wobei ein Extinktionskoeffizient von $\epsilon_{260} (P) = 6650 \text{ l} \cdot \text{Mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ verwendet wurde. Die DNA-Lösungen wurden in einem Konzentrationsbereich zwischen $5 \cdot 10^{-2} \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ - $5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ aufbewahrt. Die biologische Aktivität der DNA wurde anschließend im Transfektionsversuch bestimmt.

2.10 Präparation von ribosomaler RNA

Ribosomen von *B. subtilis* wurden freundlicherweise von G. Stöffler zur Verfügung gestellt. Daraus wurde die RNA durch Phenolextraktion gewonnen. Als Hybridisierungsreagenz mit DNA wurde RNA mit Alkali vorbehandelt (Spatz und Trautner, 1970). Hierzu wurde die RNA im Verhältnis 1 : 1 mit Aqua bidest. verdünnt, mit final 1 M NaOH 10 min bei 37° inkubiert und anschließend mit 1 M HCl zu pH 6 neutralisiert.

2.11 Einzelstrangtrennung

Die komplementären Einzelstränge denaturierter DNA von SPPI zeigen einen leichten Dichteunterschied im CsCl-Gradienten. Hierdurch wird eine präparative Trennung der DNA in ihre Einzelstränge ermöglicht. Ribosomale RNA bindet selektiv an den schweren Strang. Dadurch wird der Dichteunterschied zwischen den Einzelsträngen erhöht und es kann eine quantitative Trennung erreicht werden (Riva et al., 1968).

Entsprechend der detaillierten Versuchsbeschreibung für Einzelstrangtrennung in einem CsCl-Gleichgewichtsgradienten von Spatz und Trautner (1970) wurden 5 OD-Einheiten von DNA zusammen mit 6,5 OD-Einheiten von Alkali-vorbehandelter ribosomaler RNA für 2 min bei 100° gekocht und sofort abgeschreckt.

Bei Alkalidenaturierung wurde die DNA (5 OD-Einheiten) nach Verdünnung auf final 1 ml SSC für 2,5 min mit 0,1 ml 1 M NaOH bei 4° gehalten und für weitere 2,5 min mit Alkali-vorbehandelter ribosomaler RNA (6,5 OD-Einheiten) bei 4° behandelt. Anschließend wurde die denaturierte DNA mit 0,5 M NaH_2PO_4 neutralisiert. Denaturierung reduzierte die biologische Aktivität von transfizierender DNA um das Zehntausendfache.

Zu dem Denaturierungsgemisch wurde CsCl zugesetzt, so daß schließlich ein Gesamtvolumen von 4 ml mit einer $\rho = 1,70 \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$ erhalten wurde. Nach präparativer Ultrazentrifugation in einem Langzeitlauf für 65 h bei 37 500 rpm (Spinco, R 50 Ti) bei 4° wurden ca. 70 Fraktionen von je 0,06 ml ausgetropft. Einzelne Fraktionen wurden auf 1 ml mit 0,2 M NaCl aufgefüllt.

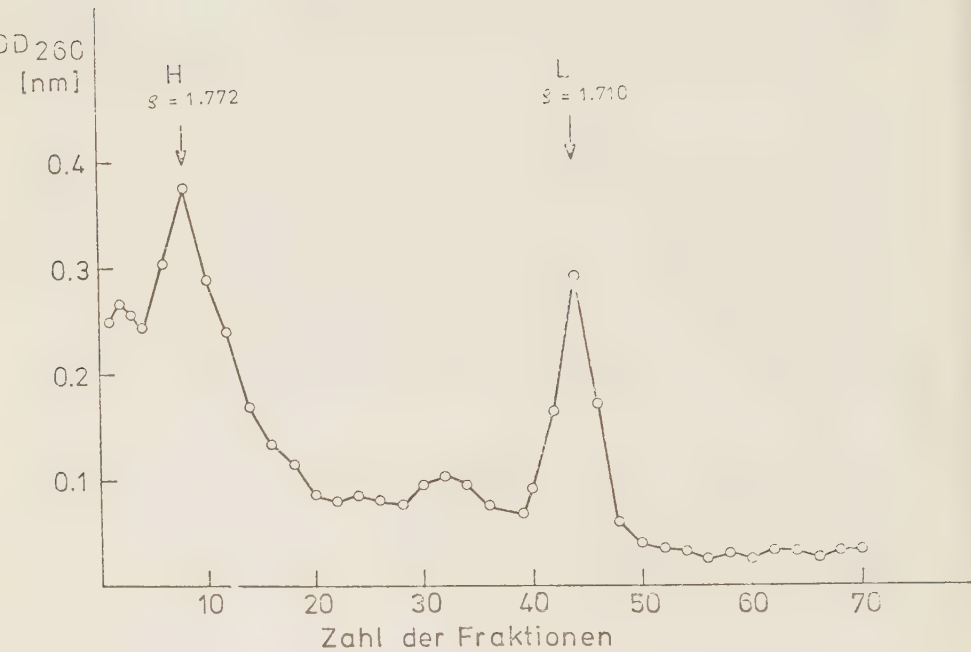


Abbildung 2 (a): Nach Hitzedenaturierung Trennung der komplementären Einzelstränge von SPP1-DNA in einem CsCl-Gleichgewichtsgradienten mit der Methode nach Riva et al. (1968). Der Dichteunterschied zwischen schwerem und leichtem Strang betrug $\Delta\rho = 0,062 \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$.

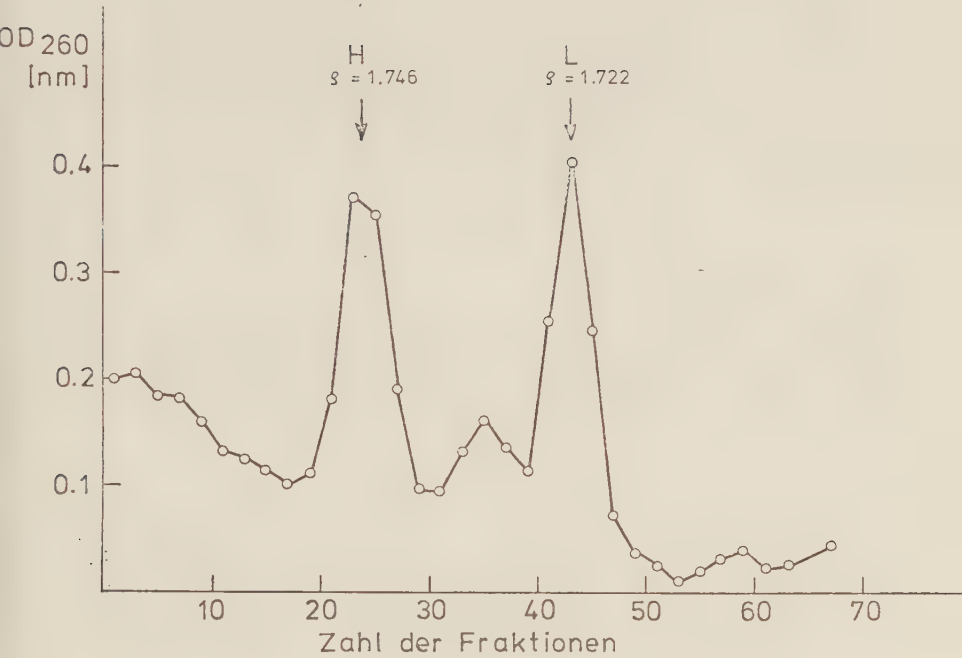


Abbildung 2(b): Nach Alkalidenaturierung Trennung der komplementären Einzelstränge von SPP1-DNA in einem CsCl-Gleichgewichtsgradienten mit der Methode nach Riva et al. (1968). Der Dichteunterschied zwischen schwerem und leichtem Strang betrug $\Delta\rho = 0,024 \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$.

Danach wurde die optische Dichte der Fraktionen bei 260 nm ermittelt. Es wurden zwei getrennte Peaks, für den schweren Strang (H) am Boden ($\rho = 1,772 \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$, Abb. 2a; $\rho = 1,746 \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$, Abb. 2b) und für den leichten Strang (L) an der Spitze ($\rho = 1,710 \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$, Abb. 2a; $\rho = 1,722 \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$, Abb. 2b) des Gradienten, erhalten. Fraktionen, die den schweren bzw. leichten Strang repräsentierten, wurden gemischt und bei 4° aufbewahrt. Der CsCl-Dichteunterschied zwischen dem schweren und leichten Strang betrug nach Hitzedenaturierung $\Delta\rho = 0,062 \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$ (Abb. 2a), nach Alkalidedenaturierung $\Delta\rho = 0,024 \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$ (Abb. 2b).

2.12 Renaturierung der DNA

Komplementäre Einzelstränge können unter bestimmten Temperatur- und Salzbedingungen renaturieren. Dabei kann ihre ursprüngliche biologische Aktivität auf ca. 10 % des Wertes vor Denaturierung wiederhergestellt werden.

Je 0,05 ml eines schweren und leichten Stranges werden gemischt und für 8 min bei 70° (Hitzedenaturierung) bzw. 15 min bei 68° (Alkalidenaturierung) gehalten. Stränge verschiedenen Genotyps lieferten Heteroduplex-, Stränge gleichen Genotyps Homoduplexmoleküle. Anschließend wurde die biologische Aktivität der Heteroduplex- bzw. Homoduplex-DNA im Transfektionssystem getestet. Für jede Mutante ergaben sich zwei Typen von Heteroduplex-DNA (Abb. 3). In der einen Kombination trug der schwere Strang das Wildtypallel, der leichte Strang das Mutantenallel. In der reziproken Kombination waren die Allele im Hinblick auf die beiden Stränge umgekehrt orientiert.

Inwieweit die getrennten Einzelstränge frei von verunreinigendem Material waren, wurde aus ihrer biologischen Aktivität vor und nach Renaturierung mit sich selbst bestimmt. Eine Restaktivität der Einzelstränge vor Renaturierung wäre entweder auf nicht vollständig denaturierte DNA oder auf teilweise Renaturierung denaturierter DNA zurückzuführen. Eine Zunahme der biologischen Aktivität nach Renaturierung würde bedeuten, daß die Einzelstränge nicht vollständig voneinander getrennt wären.

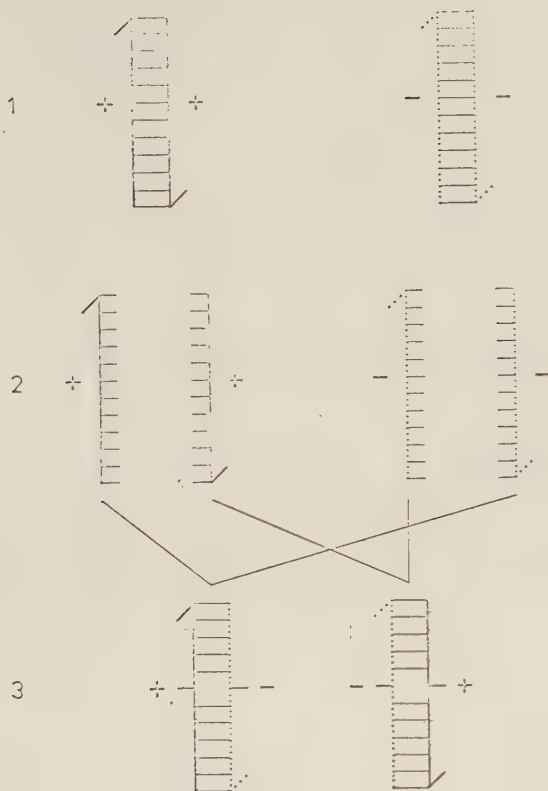


Abbildung 3: Schema der Konstruktion von Heteroduplexmolekülen:
 1: Genetisch verschiedene doppelsträngige Moleküle,
 2: Präparative Strangtrennung, 3: Zwei Heteroduplex-
 moleküle entstanden aus reziproker Hybridisierung
 komplementärer, genetisch verschiedener Stränge.

Es zeigte sich, daß der schwere Strang stets frei von biologischer Aktivität unter diesen Testbedingungen war. Der leichte Strang war geringfügig ($< 0,1 \%$) mit nativer DNA verunreinigt. Außerdem enthielt er in niedrigen Konzentrationen DNA des schweren Stranges, die offenbar keine ribosomale RNA gebunden hatte, und Material aus dem mittleren Peak (s.u.). Wenn jedoch nur die zentralen Fraktionen des leichten Stranges gesammelt wurden, betrug die Verunreinigung $10^{-3} - 10^{-5}$ von dem Wert der biologischen Aktivität, der nach Renaturierung zwischen dem schweren und leichten Strang gemessen wurde.

Zwischen dem schweren und leichten Peak trat noch ein kleiner Mittelpeak auf (Abb. 2a und Abb. 2b). Die Fraktionen waren im denaturierten Zustand mit sehr wenig nativem Material ($0,1 \%$ biologische Aktivität gegen 100% biologische Aktivität nach Renaturierung komplementärer Einzelstränge) verunreinigt. Nach Renaturierung mit sich selbst nahm die biologische Aktivität gegenüber dem nicht renaturierten Material jedoch auf das $10^1 - 10^3$ fache zu. Wahrscheinlich handelte es sich um unvollständig getrennte DNA. Am Boden des Gradienten befand sich biologisch nicht aktives Material, welches wahrscheinlich von nicht an DNA gebundener ribosomaler RNA resultierte.

2.13 Transfektion

Das biologische Verhalten der DNA wurde im Transfektionstest bestimmt (für SPP1 von Spatz und Trautner, 1970, beschrieben).

a) Kompetente Zellen: Es wurden MCB Su 3+ / SPP1 und MCB / SPP1 benutzt.

Kompetente Zellen wurden durch Wachstum einer Übernachtskultur, die von einer TBAB-Platte übertragen wurde, in Wachstumsmedium FGM (Rottländer und Trautner, 1970) nach 4 h bei 37° Inkubation (OD_{550} zu Beginn: 0,2; OD_{550} final: 1) erhalten. Anschließend wurde Glycerin (final 10% V/V) hinzugegeben. Danach wurde jeweils 1 ml der Kultur in Kunststoffröhrchen gegeben und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Solche Zellen wurden zum Experiment sehr schnell aufgetaut und 1/20 in

Wachstumsmedium SGM (Kottländer und Trautner, 1970) verdünnt. Das Maximum der Kompetenz wurde nach 120 - 180 min weiteren Wachstums bei 30° erreicht.

b.) Transfektionsversuch:

Um die Dosisabhängigkeit der Transfektion mit SPP1-DNA zu überprüfen, wurden 0,1 ml Phagen-DNA verschiedener Konzentrationen ($5 \cdot 10^{-5}$ - $5 \cdot 10^{-2}$ mg $\cdot$ ml $^{-1}$) 40 min bei 37° mit 0,2 ml kompetenten Zellen inkubiert. Die Inkubation wurde durch Zugabe von 0,2 ml pankreatischer DNase (40 μ g $\cdot$ ml $^{-1}$) beendet. Nach entsprechender Verdünnung wurden die transfizierten Zellen mit geeigneten Indikatorbakterien plattiert und für 16 h inkubiert.

Um die genetische Zusammensetzung der Infektionszentren von Heteroduplexmolekülen zu bestimmen, wurden zur Unterscheidung der Mutanten vom Wildtyp die folgenden Plattierungsbedingungen gewählt. Für die meisten amber-Mutanten wurden Heteroduplex transfizierte Zellen auf einem Mischrasen von MCB Su 3+ : 908-3 im Verhältnis 1 : 1 plattiert. Linige amber-Mutanten waren auf MCB Su 3+ allein eindeutig vom Wildtyp zu unterscheiden. Es wurden die Plattensorten LTT dp, NaCl und NB benutzt. Amber-Mutanten bildeten unter diesen Plattierungsbedingungen bei 37° Inkubation im Gegensatz zum Wildtyp Plaques ohne Ring. Die Plaques der amber-Mutanten waren ebenfalls oft kleiner als die des Wildtyps. Zur Abgrenzung der temperatur-sensitiven Mutanten vom Wildtyp wurde nach 5 h bei 30° ein Temperaturshift auf 42° durchgeführt. G 6 konnte auf 30° vom Wildtyp unterschieden werden. MCB wurde als Indikatorbakterium benutzt. Plattiert wurde für ts 3, ts 1 und ts 40 auf LTT- oder auf NB-Platten für ts 35 und G 6. Die Plaques der Mutanten sahen klein und gestochen scharf aus und hatten nur einen schwachen oder gar keinen Ring ausgebildet.

c.) Single Burst-Versuch:

Mit dem Single Burst-Versuch wurde die Nachkommenschaft aus einzelnen bakterienzellen, die mit Heteroduplexmolekülen transfiziert wurden, untersucht. Hierzu wurde zunächst die biologische Aktivität einer

Heteroduplexpräparation aus der Zahl der Infektionszentren nach Transfektion ermittelt. Die biologische Aktivität der Infektionszentren variierte in mehreren Transfektionsversuchen eines Heteroduplexmoleküls mit einem Faktor von 2 - 5. Daher wurden die mit Heteroduplex transfizierten Zellen in drei Verdünnungen, die im Mittel 0,2 0,5, 1,0 Infektionszentren pro Röhrchen enthielten, auf je 144 Röhrchen durch Austropfen verteilt. Es wurden nur Verdünnungen berücksichtigt, in denen etwa im Mittel 0,5 infizierte Zellen pro Röhrchen vorhanden waren. Nach 4 h Lyse bei 37° bzw. 30° für temperatur-sensitive Mutanten wurde der Inhalt der Röhrchen mit 0,2 ml Indikatorbakterien wie für die Infektionszentren der Heteroduplexmoleküle beschrieben wurde, plattiert und inkubiert.

2.14 DNA-Kreuzungen

Das Auflösungsvermögen von Genabständen beträgt in intra-Cistronkreuzungen für Punktmutanten auf Grund ihrer Reversionsrate von 10^{-5} ca. 10^{-3} Rekombinantenprozent. Zur "Feinstrukturanalyse" von Genabständen an der Auflösungsgrenze werden die Rekombinationshäufigkeiten aus DNA-Kreuzungen, in denen die Rekombinationshäufigkeiten um einen Faktor 10 höher liegen (Spatz und Trautner, 1971), ermittelt.

Für einige nicht komplementierende amber-Mutanten, die ja eng benachbart sein sollten, wurden daher die Rekombinationshäufigkeiten nicht nur aus Zweifaktorkreuzungen mit Phagen, sondern auch aus DNA-Kreuzungen verschiedener Mutanten bestimmt.

Es wurden kompetente Zellen von MCB Su⁺ 3+ / SPPI mit einer Mischung von zwei parentalen DNAs ($5 \cdot 10^{-3}$ mg $\cdot$ ml⁻¹ pro Parentaltyp) für 40 min bei 37° transfiziert. Das Mischungsverhältnis wurde so gewählt, daß beide parentale DNAs die gleiche Konzentration an biologischer Aktivität hatten. Nach Lyse für 3 h bei 37° wurde der Prozentsatz der Wildtyprekombinanten mit denselben Indikatorbakterien wie bei den Phagenkreuzungen bestimmt (Spatz und Trautner, 1971).

3. Ergebnisse

3.1 Isolierung der amber-Mutanten

Nach Hydroxylamin-Mutagenese wurden aus verschiedenen mutagenisierten Phagenlysaten insgesamt 36 amber-Mutanten isoliert. 4 dieser Mutanten zeigten auf MCB (Genotyp: su^-) eine geringe Wachstumsfähigkeit ("leakiness"). Das Verhältnis dieser amber-Mutanten auf MCB zu MCB Su^+ betrug 10^{-3} . 7 Mutanten hatten nur eine geringe Vermehrungsrate, d.h. die Konzentration in einem 20 ml-Lysat lag zwischen $10^4 - 10^6$ Phagen $\cdot ml^{-1}$. Die übrigen 25 amber-Mutanten, die für die weitere Analyse benutzt wurden, hatten eine normale Vermehrungsrate auf einem su^+ -Bakteriumstamm ($10^9 - 10^{10}$ Phagen $\cdot ml^{-1}$ in einem 20 ml-Lysat) und einen niedrigen Revertantenprozentsatz ($< 10^{-4}$).

3.2 Charakterisierung von amber-Mutanten

3.2.1 Komplementation

Die 25 amber-Mutanten wurden durch Komplementationsspot-Test in Gruppen identischer Funktionen klassifiziert.

In einem Komplementationstest infizierten zwei Mutanten Bakterienzellen unter Bedingungen, bei denen sich die Mutanten allein nicht vermehren konnten. Zwei Mutanten, die in nicht identischen Funktionen defekt sind, sollten ihre Defekte kompensieren und Phagen produzieren können. Andererseits wurden für zwei Mutanten, die in derselben Funktion defekt waren, nur wenige oder keine Phagen erwartet. Die Bewertungen der Komplementationsergebnisse sind in der Tabelle 3 für einige amber- und temperatur-sensitive Mutanten wiedergegeben. Wenn zwei Mutanten entsprechend dem Schema in der Abbildung 4 in den folgenden vier Konzentrationsverhältnissen a, b, c, d vollständig oder teilweise miteinander komplementieren, wurden diese verschiedenen funktionellen Gruppen zugeordnet. Demnach gehörten die Mutanten am 102 mit am 61, am 111, am 112, am 122 und am 126 mit am 31 und am 40 in verschiedene Cistronen (Tabelle 3).

	ts 50 ¹⁾ ~10 ⁷ ~10 ⁶	am102 ~10 ⁷ ~10 ⁶	am61 ~10 ⁷ ~10 ⁶	am111 ~10 ⁷ ~10 ⁶	am112 ~10 ⁷ ~10 ⁶	am122 ~10 ⁷ ~10 ⁶	ts 40 ~10 ⁷ ~10 ⁶	ts 31 ~10 ⁷ ~10 ⁶	am126 ~10 ⁷ ~10 ⁶
ts50 ¹⁾	~10 ³ ~10 ²								
am102	⊙⊙⊙⊙⊙	4 0							
am61	⊙⊙⊙⊙⊙		17 3						
am111	- -	⊙⊙⊙⊙⊙	⊙⊙⊙⊙⊙	9 0					
am112	- -	⊙⊙⊙⊙⊙	⊙⊙⊙⊙⊙	⊙⊙⊙⊙⊙	26 2				
am122	⊙⊙⊙⊙⊙	⊙⊙⊙⊙⊙	⊙⊙⊙⊙⊙	⊙⊙⊙⊙⊙	⊙⊙⊙⊙⊙	36 4			
ts40	- -	⊙⊙⊙⊙⊙	⊙⊙⊙⊙⊙	- -	- -	⊙⊙⊙⊙⊙	143 26		
ts31	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	128 15	
am126	- -	⊙⊙⊙⊙⊙	- -	⊙⊙⊙⊙⊙	⊙⊙⊙⊙⊙	- -	- -	⊙⊙⊙⊙⊙	32 5

Tabelle 3: Komplementationstest zwischen einigen amber- und temperatur-sensitiven Mutanten. Die Konzentration der aus-

plattierten Mutante ($\sim 10^7$ bzw. $\sim 10^6$ Phagen/ml⁻¹) ist in der waagrechten Spalte angegeben. Die Kästchen

- symbolisieren die Komplementation der ausgetropften Mutante verschiedener Konzentrationen ($\sim 10^7$, $\sim 10^6$, $\sim 10^5$ bzw. $\sim 10^6$, $\sim 10^5$ Partikel/ml⁻¹). Das Muster der Kästchen hat folgende Bedeutung: ⊙ = starke Komplementation

(Lysis), ⊙ = schwache Komplementation (ca. 20 - 40 Plaques), ⊖ = keine Komplementation (< 10 Plaques),

○ = keine Komplementation (keine Lysis). Die Zahlen geben den Revertantensatz der getesteten Mutanten an.

¹⁾ Da ts50 allein unter Komplementationsbedingungen winzige Plaques zeigte, war diese Mutante leaky.

Wenn zwei Mutanten entsprechend dem Schema in der Abbildung 4 in den vier folgenden Konzentrationsverhältnissen b, c, d, e wenige oder keine Plaques bildeten, wurden diese einer gemeinsamen funktionellen Gruppe zugeordnet. Die amber-Mutanten am 102, am 61, am 111, am 112 und am 122 lagen demnach in einem Cistron und die Mutanten am 126, ts31 in einem anderen Cistron (Tabelle 3).

Auf diese Weise wurden die 25 amber-Mutanten 9 funktionellen Gruppen zugeteilt. Eine Zusammenstellung der 9 Cistronen für amber-Mutanten gibt die Tabelle 4 wieder. Weiterhin lagen am 82 mit ts 35 und am 126

	Konzentrationsverhältnisse				
	a	b	c	d	e
Plattierte Mutante (Phagen ml ⁻¹)	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁶
Getropfte Mutante (Phagen ml ⁻¹)	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁵

Abbildung 4: Schema der Konzentrationsverhältnisse
im Komplementationstest

mit ts31 in einer gemeinsamen Komplementationsgruppe. Da die temperatur-sensitive Mutante 50 leaky war, konnte nicht eindeutig entschieden werden, ob ts 50 und die benachbarten amber-Mutanten aus der Komplementationsgruppe am 102 - am 131 in verschiedenen Cistronen lagen (Tabelle 3). Weiterhin lagen ts 3 und am 99 sowie ts 40 und die amber-Mutanten aus der Komplementationsgruppe am 102 - am 131 in getrennten Cistronen. Somit konnten einschließlich der beiden Cistronen mit temperatur-sensitiven Mutanten insgesamt 11 eindeutig definierte Cistronen den Mutanten zugeordnet werden.

Tabelle 4 : Komplementationsgruppen der amber-Mutanten

Mutanten	Komplementationsgruppe
am109	1
am99	2
ts 35	3
am82	3
am117	4
am128	4
am102	5
am61	5
am64	5
am92	5
am98	5
am124	5
am111	5
am112	5
am122	5
am131	5
ts 31	6
am126	6
am129	6
am100	6
am115	6
am118	6
am114	7
am119	7
am106	7
am62	8
am87	9

3.2.2 Rekombination

In Zweifaktorkreuzungen zwischen amber-Mutanten wurde die Häufigkeit von Wildtyprekombinanten bestimmt. Zusätzliche Kreuzungen mit Plaque-typ- und temperatur-sensitiven Mutanten ermöglichten die Einordnung der amber-Mutanten in die bisher bekannte Genkarte von SPPI (Spatz und Trautner, 1971). Wegen der mühevollen Isolierungsmethode von Doppelmutanten wurden Dreifaktorkreuzungen nur in einem Falle zwischen der amber-Doppelmutante am 118 am 119 und amber-Einzelmutanten durchgeführt. Zur Isolierung von Doppelmutanten nach Kreuzungen zwischen Einzelmutanten mußten alle Mutantenplaques abgeimpft und durch Komplementation bzw. Rekombination auf ihren Mutantengenotyp hin getestet werden, da sich Doppelmutanten plaquemorphologisch von Einzelmutanten nicht unterscheiden ließen.

Die Kreuzungsdaten sind in den Tabellen 5 - 12 wiedergegeben. Die Abbildung 5 a gibt eine Zusammenstellung der Kreuzungsdaten, die zur Anordnung der Mutanten in einer Genkarte geführt haben. Unter der Voraussetzung, daß die nicht selektionierten reziproken Rekombinanten (Doppelmutanten) mit der gleichen Häufigkeit wie die Wildtyprekombinanten auftreten, ergab sich aus der Summierung der Abstände zwischen benachbarten Mutanten eine Genkarte mit einer Länge von 2×49 Rekombinationseinheiten. In einigen Fällen, in denen direkt benachbarte Mutanten nicht miteinander gekreuzt wurden (1. am 99 x 516; 2. L 61 x ts 58; 3. am 128 x 111; 4. 111 x ts 50; 5. am 112 x 161; 6. 161 x ts 31), wurden die Abstände aus den Kreuzungen der am nächsten liegenden Mutanten ermittelt (zu 1.: 515 x 516; zu 2.: L 61 x 111; zu 3.: am 117 x 111; zu 4.: am 82 x ts 50; zu 5.: am 61 x 161; zu 6.: 161 x am 126). Weiterhin wurde die relative Position von 515 gegenüber ts 3 aus der Genkarte von Spatz und Trautner (1971) übernommen, da unter den Plattierungsbedingungen für amber-Mutanten die Mutante 515 gegenüber dem Wildtyp nicht zu unterscheiden war.

Tabellen 5 - 11: Zweifaktorkreuzungen

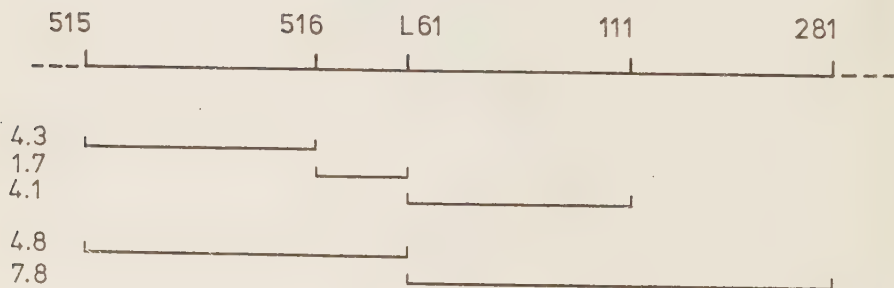
In den folgenden Tabellen sind die Prozentsätze der Wildtyprekombinanten aus Zweifaktorkreuzungen zusammengefaßt. Hieraus wurden die Genabstände auf dem SPPI-Genom ermittelt. Entsprechend der Reihenfolge der amber-Mutanten auf der Genkarte von links nach rechts sind die Kreuzungsdaten der amber-Mutanten in 5 Einheiten zusammengefaßt. Die Tabellen enthalten die Rekombinationswerte aus Kreuzungen zwischen amber- und bereits kartierten temperatur-sensitiven und Plaquetypmutanten in verschiedenen Kombinationen. Tabelle 6 enthält ausschließlich Kreuzungsdaten von Plaquetypmutanten zur Lokalisierung von L 61. In Tabelle 9 sind die Rekombinationswerte aus Kreuzungen zwischen ts 40 und amber- sowie temperatur-sensitiven Mutanten wiedergegeben.

Wenn für ein Mutantenpaar Kreuzungen wiederholt wurden, so wurde der Rekombinationswert als arithmetischer Mittelwert mehrerer Wildtyp-prozentsätze angegeben. Die Reproduzierbarkeit der Rekombinations-prozentsätze betrug $\pm 30\%$. Da für die Bestimmung des Wildtypanteils die Gesamtzahl der gezählten Plaques zwischen 100 und 500 lag, waren Genabstände, die kleiner als $0,5\%$ Wildtyprekombinanten waren, nicht statistisch abgesichert.

Unter jeder Tabelle ist die teilweise Genkarte, die sich aus den jeweiligen Rekombinantenprozentsätzen ergibt, abgebildet.

Tabelle 6 :

Mutanten	516	L61	111	281
515	4.3	4.8		
516		1.7		
L61			4.1	7.8



Bemerkung: Da die Kontrollkreuzungen zwischen 515 und 516 unter den hier benutzten Kreuzungsbedingungen (Indikatorbakterium: Su 3+; Plattensorte: NB) höhere Prozentsätze von Wildtyprekombinanten als es der Genkarte nach Spatz und Trautner (1971) entsprach lieferten, konnte für L61 nur die relative Lage zwischen 516 und 111 bestimmt werden.

Tabelle 7 :

Mutanten	am82	ts35	am117	am128	111	ts50
am109		9.5		9.7		
ts34	9.4					
ts58	0.7					
am82		0.08	1.0	2.8		4.2
ts35			0.6	2.9		2.9
am117				1.5	2.4	

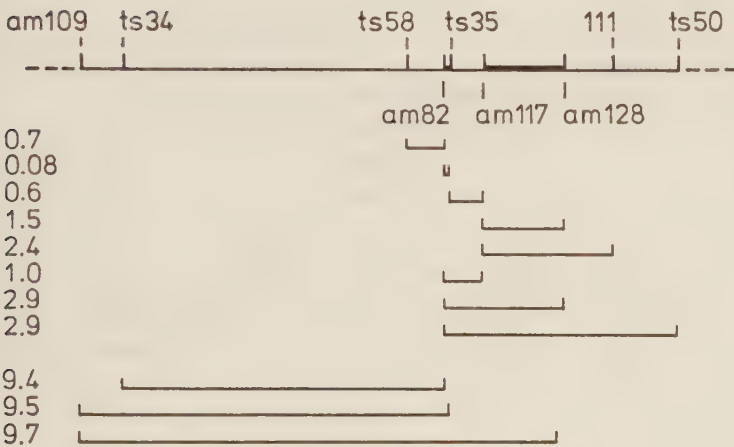


Tabelle 8:[illegible]

Tabelle 7 :

Mutanten	am82	ts35	am117	am128	111	ts50
am109		9.5		9.7		
ts34	9.4					
ts58	0.7					
am82		0.08	1.0	2.8		4.2
ts35			0.6	2.9		2.9
am117				1.5	2.4	

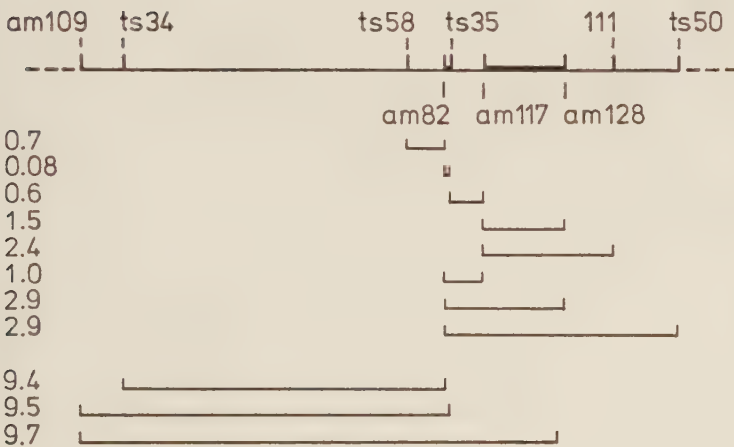


Tabelle 8:[illegible]

Genkarte mit Diagramm zur Tabelle 8:

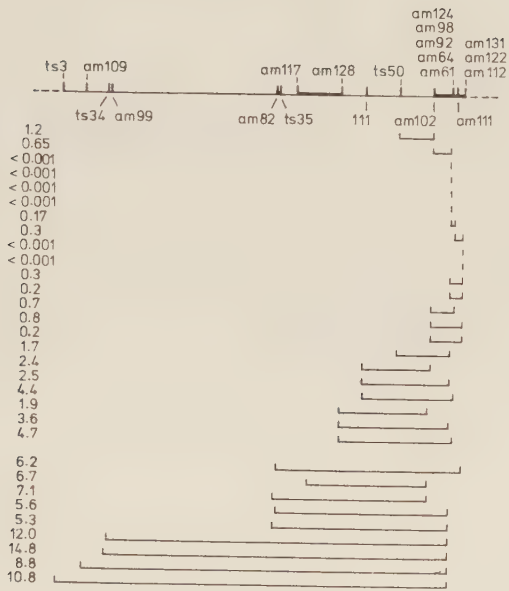


Tabelle 8a: Darstellung der Kreuzungen für einige amber- und temperatur-sensitive Mutanten

In dieser Tabelle sind Kreuzungen für einige amber- und benachbarte temperatur-sensitive Mutanten ausführlich wiedergegeben. Die ausgewählten Mutanten sind in der Tabelle 8 bzw. 9 unterstrichen. Es wurden die bestimmten Plaquezahlen der Wildtyprekombinanten und der gesamten Phagen, der Korrekturfaktor für die relative e. o. p. unter selektiven und nicht selektiven Bedingungen, der Prozentsatz von Wildtyprekombinanten, sowie die Wurfgröße der Phagen im Kreuzungsgemisch nach 3 h Lyse wiedergegeben. Für einige Mutantenpaare wurden Kreuzungen wiederholt. In diesen Fällen wurden die Prozentsätze der Wildtyprekombinanten für jeden Kreuzungsversuch einzeln, sowie der arithmetische Mittelwert aus diesen Prozentsätzen der Wildtyprekombinanten in der Tabelle aufgeführt.

Tabelle 6a: Darstellung der Kreuzungen für einige amber- und temperatur-sensitive Mutanten

Kreuzung	Verdünnung	Plaquezahlen (Zahl der Wildtyp- phagen auf Su^- / Gesamtzahl der Phagen auf Su^+)	e.o.p.	Prozentsatz der Wildtyp Rekombinan- ten	Arithmetisches Mittel des Prozentsatzes der Wildtyp- rekombinanten	Wurfgröße
ts50 x am102	1/100	6/284	3.7	0.6		
	1/100	9/260	3.7	1.0		76
	1/100	44/104	2.1	2.0	1.2	170
	1/1000					
x am61	1/100	16/518	1.8	1.7		20
x am111	1/10	162/256	1.8	3.3		
	1/100					
x am112	1/10	206/329	1.8	3.4		
	1/100					
x am122	1/100	20/159	3.7	3.4		
	1/100	62/43	2.1	3.3	3.35	70
	1/100					
x ts40	1/100	27/708	1.8	2.2		40
am102 x am61	1/1	416/211	3.9	0.5		30
	1/100	13/360	4.5	0.8	0.65	20
	1/100					
x am111	1/1	69/269	3.9	0.7		3
	1/10					

Kreuzung	Verdünnung	Plaquezahlen (Zahl der Wildtyp- phagen auf Su ⁻ / Gesamtzahl der Phagen auf Su ⁺)	e.o.p.	Prozentsatz der Wildtyp Rekombinan- ten	Arithmetisches Mittel des Prozentsatzes der Wildtyp- rekombinanten	Wurfgröße
am102 x am112	1/1 1/10	115/ 384	3,9	0,8		2
x am122	1/10 1/100	3/ 64	2,1	0,2		9
x ts40	1/100 1/100 1/1000	99/477 370/ 201	1,8 2,1	11,3 8,8	10,1	100
er61 x am111	1/1 1/100 1/10 1/100 1/10 1/100	35/ 69 8/ 225 60/ 274	3,9 2,4 1,5	0,1 0,2 0,2	0,17	10 50 10
x am112	1/1 1/100	178/ 126	3,9	0,4		25

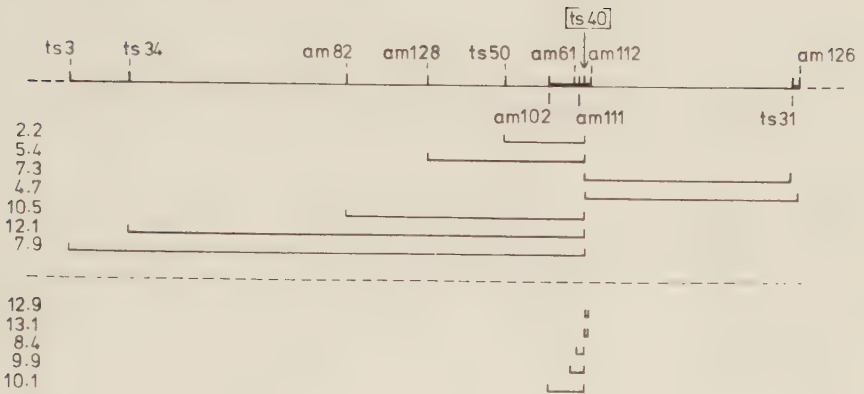
Fortsetzung der Tabelle 8a:

Kreuzung	Verdünnung	Plaquezahlen (Zahl der Wildtyp- phagen auf Su ⁻ / Gesamtzahl der Phagen auf Su ⁺)	e.o.p.	Prozentsatz der Wildtyp- Rekombinan- ten	Arithmetisches Mittel des Prozentsatzes der Wildtyp- rekombinanten	Wurfgroße
am61 x am12	1/1 1/100	51/ 161	1.5	0.2	0.3	40
x am122	1/1 1/100 1/1 1/100 1/10	54/ 154 11/ 454 11/ 398	1.5 1.5 4.0	0.2 0.3 0.1		20 90 100
x ts40	1/1000 1/1000 1/1000	49/102 22/174 116/220	3.5 1.5 7.0	13.7 8.4 7.6	0.2	190 100 20
am111 x ts40	1/100 1/1000	97/ 63	1.8	8.4		-
ts40 x ts31	1/1000 1/1000 1/100 1/1000	43/174 36/324 598/ 124	3.5 1.5 7.0	7.1 7.4 7.1		110 200 100

Tabelle 9 :

Mutanten	ts40	ts31	am126
ts3	7.9		
ts34	12.1		
am82	10.5		
am128	5.4		
ts50	<u>2.2</u>		
am102	<u>10.1</u>		
am61	<u>9.9</u>		
am111	<u>8.4</u>		
am112	13.1		
am122	12.9		
ts40		<u>7.3</u>	4.7

Genkarte mit Diagramm zur Tabelle 9:



Bemerkung: Im Diagramm sind die Rekombinationswerte, die zur Anordnung von ts 40 auf der Genkarte geführt haben, wiedergegeben; ebenso unter der gestrichelten Linie die abweichenden Rekombinationswerte aus Kreuzungen zwischen amber-Mutanten des Cistrons am 102 - am 112 und ts 40. Die Position von ts 40 ist nicht genau bekannt. Obwohl der Rekombinationswert aus der Kreuzung ts 50 x ts 40 zu einer Einordnung von ts 40 in das Cistron am 102 - am 112 führte, wurde durch Komplementation nachgewiesen, daß ts 40 nicht im Cistron am 102 - am 112 liegt. Es kann auf Grund der geringeren Empfindlichkeit der Rekombinationswerte (Reproduzierbarkeit der Rekombinationsprozentsätze $\pm 30\%$) angenommen werden, daß ts 40 dem Cistron am 102 - am 112 benachbart ist.

Tabelle 10 :

Mutanten	161	ts31	am126	am129	am100	am115	am118
ts3		18.3					
am109			10.0				
am99			17.8				
am82			13.6				
am117	9.1						
am128			9.6				
111	10.6						
am102	5.1						
am61	4.5		8.7				
161			1.6		1.0		
ts31			0.2		0.8		3.7
am126				<0.01	0.6	0.6	2.4
am129					0.4	0.7	4.7
am100						<0.01	0.8

Genkarte mit Diagramm zur Tabelle 10:

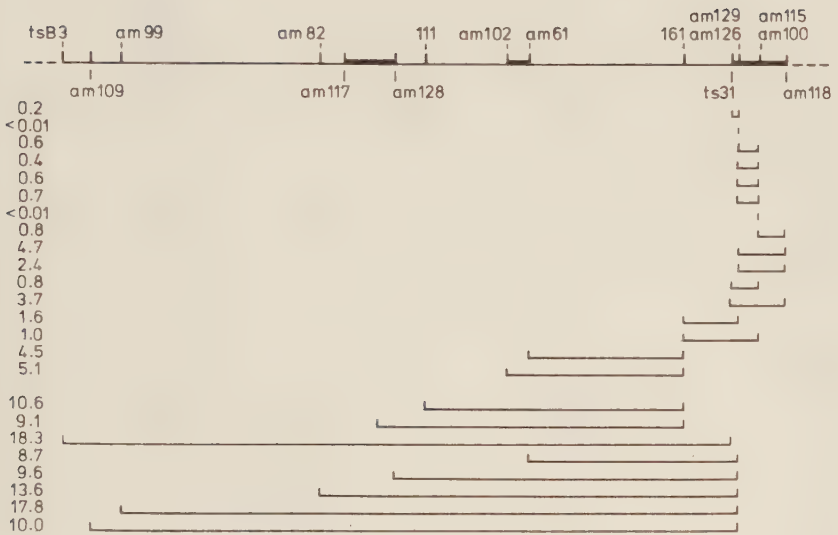


Tabelle II:

Mutanten	NOH3	aml14	aml19	aml06	am62	am87
ts 3			13,8		11,2	
aml09			8,3		9,6	13,0
ts34			7,3		15,4	
am99			12,2		13,7	
am82			12,0	11,1	12,8	13,6
ts35			10,3			
aml28					13,3	
am61			12,0	15,7	17,8	8,4
aml22					18,2	15,6
ts40			6,0	11,4	16,1	
ts31			8,1	11,3	8,3	
aml26			9,7	22,2	9,4	6,1
aml00	5,7					
aml18	6,4	8,6	9,8	6,6	8,1	
NOH3		7,9	8,2	5,2	11,1	
aml14			0,04	0,3	3,7	
aml19				0,2	3,8	4,3
aml06					3,1	4,2
am62						0,4

Bemerkung: Es wurden nur einige der Rekombinationswerte im Sättigungsbereich für die Genkarte, die sich aus den Daten dieser Tabelle ergeben, in der Darstellung auf der folgenden Seite wiedergegeben.

Tabelle 12 : Häufigkeit der Prozentsätze von Wildtyprekombinanten aus Dreifaktorkreuzungen zwischen am118, am119 und amber-Einzelmutanten und aus Zweifaktorkreuzungen der amber-Mutanten, die in Dreifaktorkreuzungen verwendet wurden.

Kreuzungen	Rekombinationshäufigkeit für Einzelaustausch (Wildtyp %)	beobachtete Rekombinationshäufigkeit für Doppelaustausch (Wildtyp %)	berechnete Rekombinationshäufigkeit für Doppelaustausch (Wildtyp %)
am114 x am118	0.14		
am114 x am119	0.03		
am114 x am118am119		0.004	0.005
am106 x am118	0.04		
am106 x am119	0.002		
am106 x am118am119		0.008	0.009
am62 x am118	0.19 (0.21)		
am62 x am119	0.07 (0.07)		
am62 x am118am119		0.03 (0.02)	0.01 (0.01)

Die in Klammern gesetzten Werte geben die Häufigkeiten bei der Wiederholung der Kreuzungen an.

Abbildung 5: Genkarte von SPP1

- a.) Das Diagramm gibt eine Zusammenfassung der Kreuzungen benachbarter Mutanten und einiger Kreuzungen zwischen weiter entfernt liegenden Mutanten aus den Tabellen 5 - 11 (siehe ausführliche Erklärung hierzu im Text!).
- b.) Zwischen ts G 6 und am 87 ergibt sich für die Genkarte von SPP1 eine Länge von 2×49 Rekombinationseinheiten. Auf der Genkarte ist ebenfalls der Bruchpunkt, der bei ts 35 liegt, eingetragen. Die Position von ts 40 ist nicht genau bekannt (siehe Bemerkung zur Tabelle 9!).

Abbildung 5 a:

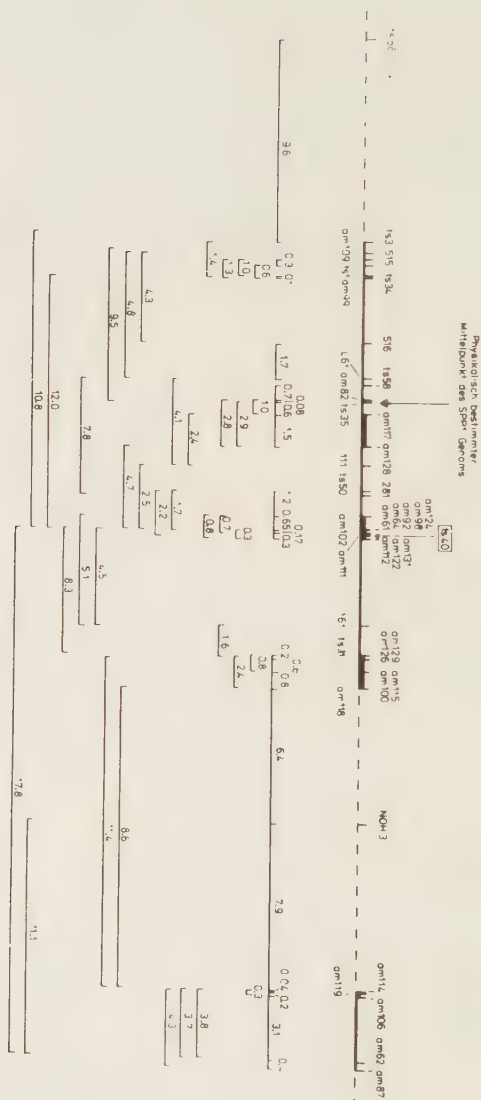
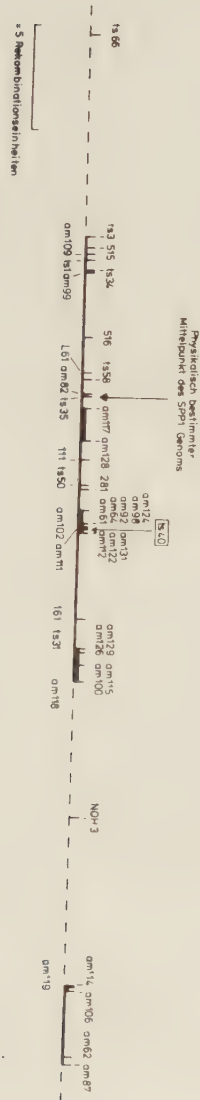


Abbildung 5b:



Rekombinationswerte waren bis zu 2,5 % Wildtyp additiv. Bei größeren Genabständen wurde ein Sättigungswert bei ca. 10 - 18 % Wildtyp erreicht. Es konnten daher Wildtyprekombinantenprozentsätze > 10 % nicht benutzt werden, um Genabstände zu bestimmen (für die benachbarten Mutanten ts G 6 und ts 3, am 118 und NOH3 und NOH3 und am 114).

Da der Abstand zwischen der am 118-Region bzw. NOH3 und der am 114-Region nicht im Bereich der Additivität lag, konnten keine genaueren Aussagen über die Reihenfolge von am 62 zu den Mutanten aus der am 114-Region gemacht werden. Es wurden daher Dreifaktorkreuzungen zwischen der Doppelmutante am 118 am 119 und den Einzelmутanten am 114, am 119, am 106 und am 62 durchgeführt (Tab. 12). Aus dem Vergleich zwischen dem experimentellen Wert für Wildtyprekombinanten aus Dreifaktorkreuzungen mit dem berechneten Wert, der aus den Rekombinationswerten von parallel durchgeführten Zweifaktorkreuzungen bestimmt wurde, wurde eine Reihenfolge von am 118, am 119, am 62 ermittelt.

In Kreuzungen zwischen einigen amber-Mutanten (in der Genkarte der Abbildung 5 a und 5 b übereinander angeordnet) konnten in Phagenkreuzungen keine Rekombinanten nachgewiesen werden. Sie wurden daher als identisch bezeichnet. Wegen des relativ hohen Revertantensatzes bei Punktmutationen ist die Auflösung in verschiedene Mutationsorte auf einen Rekombinationswert von 0,01 % begrenzt. Da DNA-Kreuzungen für SPPI und SP50 eine erhöhte Empfindlichkeit in der Auflösung von Genabständen zeigten (Spatz und Trautner, 1971), wurden für die amber-Mutanten am 61, am 64, am 92, am 98 und am 124 neben Phagenkreuzungen DNA-Kreuzungen durchgeführt. Obwohl bis zu einem Abstand von 5 % Rekombinationseinheiten bei DNA-Kreuzungen die Rekombinationswerte um einen Faktor von ca. 10 höher liegen (Spatz und Trautner, 1971), lagen die Rekombinationswerte unterhalb der Auflösungsgrenze von 0,01 %. Andererseits wurden diese Mutanten aus drei unabhängig ausgeführten Mutagenesen isoliert. Hiermit wurde weitgehend eingeschränkt, daß identische Mutanten durch dieselben abgeimpften Mutanten vorgetäuscht wurden.

Aus den Kreuzungen für amber-Mutanten wie für Plaquetyp- und temperatur-sensitiven Mutanten folgte, daß die Anordnung der Gene linear ist. Dieser genetische Befund deckt sich mit physiko-chemischen Daten (Klotz, 1973): Es wurde ein eindeutiger Bruchpunkt in der Nähe von ts 35 auf dem SPP1-Genom ermittelt (siehe auch Abb. 5 b). Hierzu wurden DNA-Moleküle zu DNA-Hälften gesichert. Anschließend wurde die Konzentrationsabhängigkeit der Transfektion für DNA-Hälften im Marker-Rescue-System mit genetisch verschieden markierten "Helfer"-Phagen untersucht. In diesem System wurden für verschiedene Marker-Paare neben linearen Abhängigkeiten der Anzahl transfizierter Zellen von der Konzentration transfizierender DNA quadratische Dosisabhängigkeiten beobachtet. Hieraus wird der Bruchpunkt auf dem SPP1-Genom bestimmt. Aus der Hybridisierbarkeit denaturierter DNA-Einzelstränge zu biologisch aktiver doppelsträngiger DNA für den Phagen SPP1 folgte ebenfalls eine lineare Genanordnung.

Der Abstand zwischen den amber-Mutanten aus dem Cistron am 102 - am 112 und der temperatur-sensitiven Mutante 40, die nicht innerhalb dieses Cistrons liegt, konnte wegen der abweichenden hohen Rekombinationshäufigkeiten aus Zweifaktorkreuzungen zwischen diesen Mutanten nicht bestimmt werden. Diese Rekombinationswerte lagen um ein bis zwei Größenordnungen höher als es dem erwarteten Genabstand von $< 0,5\%$ Wildtyprekombinanten, der sich aus der Kreuzung zwischen ts 50 und ts 40 ergab, entsprach (Tab. 9). Kreuzungen zwischen der Mutante am 128 und ts 40 bzw. einer der amber-Mutanten aus dem Cistron am 102 - am 112 ergaben etwa die erwarteten Rekombinationswerte. Ebenso entsprachen die Wildtypprozentsätze aus Kreuzungen zwischen amber-Mutanten aus dem Cistron am 102 - am 112 und ts 50 additiven Genabständen. Die erhöhten Rekombinationshäufigkeiten aus Kreuzungen zwischen ts 40 und den erg benachbarten amber-Mutanten werden in der Diskussion behandelt.

Dreifaktorkreuzungen zwischen ts 40 enthaltenen temperatur-sensitiven Doppelmutanten und am 61 aus dem Cistron am 102 - am 112 zeigten das bei anderen Phagen beobachtete Phänomen der "negativen Interferenz". Der Grad der Interferenz wird durch den Koinzidenzfaktor K, der aus dem

Quotienten von beobachteten zu erwarteten Doppelrekombinanten in Dreifaktorkreuzungen bestimmt wird, angegeben. Für negative Interferenz ist K größer als 1. In der Tabelle 13 sind die Koinzidenzfaktoren aus Dreifaktorkreuzungen vom Typ $b \times ac$ zwischen am 61 und temperatur-sensitiven Doppelmutanten wiedergegeben, die größer als 1 waren.

Tabelle 13: Dreifaktorkreuzungen zwischen am61 und verschiedenen ts-Doppelmutanten vom Typ b x ac.

Genanordnung:	(ts 3 bzw. ts 35)	(am61)	(ts 40)
	a	b	c
	R_1	R_D	R_2

Die alphabetische Beziehung gibt die Genanordnung der Mutanten auf der Genkarte von links nach rechts wieder. Der Rekombinantenprozentsatz des Wildtyps wird zwischen a und b mit R_1 zwischen b und c mit R_2 , zwischen a und b und b und c mit R_D bezeichnet.

Kreuzungen	R_1	R_2	$R_{D\text{erwart.}}$	$R_{D\text{beob.}}$	$K = \frac{R_{D\text{beob.}}}{R_{D\text{erwart.}}}$
am 61 x ts 3	0.18				
am61 x ts 40		0.09			
am61 x ts3-ts40			0.02	0.06	3
am61 x ts 35	0.06				
am61 x ts 40		0.14			
am61 x ts35-ts40			0.01	0.02	2

3.3 Konversion

3.3.1 Allgemeine Beschreibung der Versuchsergebnisse

Nach präparativer Trennung der komplementären Einzelstränge von SPPI-DNA im CsCl-Dichtegradienten (Riva et al., 1968) wurden reziproke Heteroduplexmoleküle für amber- und temperatur-sensitive Mutanten durch Renaturierung zwischen komplementären Wildtyp- und Mutanteneinzelsträngen hergestellt. Es wurde die Nachkommenschaft von Heteroduplex-DNA untersucht, um daraus Schlüsse auf die Konversion zu ziehen. Bei Konversion von Heteroduplex-DNA werden heterologe Basenpaare zu einer homologen Konfiguration umgewandelt.

Hierzu wurden kompetente Zellen von *B. subtilis* mit Heteroduplex-DNA transfiziert. Die Phagennachkommenschaft von transfizierten Zellen wurde mit der Single Burst-Technik und durch Plattierung der transfizierten Zellen vor der Lyse ("Infektionszentren") untersucht. Die Ergebnisse werden durch die Häufigkeiten der folgenden drei möglichen Arten von Würfeln beschrieben: Mischwürfe mit Phagen, die das Wildtyp- und das Mutantenallel des Heteroduplexmoleküls enthalten, reine Wildtyp- und reine Mutantenwürfe.

Ein ausführliches Beispiel für die Bestimmung der Konversionsdaten ist in der Tabelle 14 für das Heteroduplexpaar der temperatur-sensitiven Mutante 1 dargestellt. Es sind zunächst die Plaquezahlen der transfizierten Zellen als Infektionszentren wiedergegeben. Plaquemorphologisch lassen sich hier Misch- und reine Wildtypwürfe als Infektionszentren nicht voneinander unterscheiden. Es kann daher nur die Summe der Häufigkeiten für Misch- und reine Wildtypwürfe neben der Häufigkeit für reine Mutantenwürfe aus den Plaquezahlen der Infektionszentren bestimmt werden (1). Im Single Burst-Versuch wird zuerst aus der Zahl der Würfe ohne Phagen bezogen auf die Gesamtzahl der untersuchten Würfe der Prozentsatz der Platten ohne transfizierte Bakterien bestimmt (2). Daraus wird nach der Poissonverteilung

$$p(n) = \frac{e^{-m} m^n}{n!}$$
 und dem experimentell zugänglichen 0 Term $p(0) = e^{-m}$ der

Tabelle 14 : Bestimmung der Häufigkeiten von Misch- und reinen Würfen nach Transfektion mit Heteroduplex-DNA der temperatur-sensitiven Mutante 1.

Eine ausführliche Erklärung zur Tabelle wird im Text gegeben.

Genotyp des	schwerer	leichter
Heteroduplex:	Strang	Strang
	H	L
	+	1

Infektionszentren:

=====

(1) Verteilung der verschiedenen Wurfotypen unter den Infektionszentren

	Gesamtzahl der untersuchten Infektionszentren	Genotyp der Infektions- zentren mit Wildtyp und Wildtyp Mutante Mutante allein allein	Mutante allein
Plaquezahlen	602	575	27
Häufigkeiten	1,00	0.96	0.04

Einzelwürfe:

=====

(2) Gesamtzahl der untersuchten Platten	Platten ohne Phagenwurf	Platten mit Phagenwurf
142	83	59

(3) Berechnung der mittleren Bakterienzahl (m) /Platte nach Poisson:

$$p(0) = e^{-m} = \frac{83}{142} = 0.58$$

$$m = 0.54$$

Fortsetzung der Tabelle 14:

(4) Verteilung verschiedener Wurfotypen unter 59 Würfeln = 1,00

	Genotyp der Würfe mit		
	Wildtyp und Mutante	Wildtyp allein	Mutante allein
Zahl der Würfe	28	25	6
Häufigkeiten	0.4 ₆	0.4 ₂	0.1 ₂

(5) Anzahl der Phagen in einzelnen Würfeln:

Würfe mit		Wildtyp allein	Mutante allein
Wildtyp	Mutante		
80	2	84	36
10	69	116	72
28	5	103	100
79	1	2	36
155	11	77	1
120	25	117	30
11	4	56	
101	21	70	
46	26	163	
226	1	1	
98	10	1	
67	11	30	
152	2	1	
37	1	70	
33	2	111	
25	8	99	
43	2	92	
38	3	52	
39	17	65	
23	7	31	
66	33	18	
47	2	46	
21	1	100	
152	8	42	
6	27	98	
35	3		
55	2		
188	2		
Σ 1944	Σ 348		

Fraktion des Wild-
typs in den Misch-
würfen

0.85

Fortsetzung der Tabelle 14:

(6) Bevorzugter Strang: H

=====

Genotyp des Heteroduplex	schwerer Strang H	leichter Strang L
	1	+

Infektionszentren:

=====

(1) Verteilung der verschiedenen Wurfotypen unter den Infektionszentren

	Gesamtzahl der untersuchten Infektionszentren	Genotyp der Infektionszentren mit Wildtyp und Mutante	Wildtyp allein	Mutante allein
Plaquezahlen	436		254	182
Häufigkeiten	1.00		0.58	0.42

Einzelwürfe:

=====

(2) Gesamtzahl der untersuchten Platten	Platten ohne Phagenwurf	Platten mit Phagenwurf
142	115	27

(3) Berechnung der mittleren Bakterienzahl (m) /Platte nach Poisson:

$$p(0) = e^{-m} = \frac{115}{142} = 0.81$$

$$m = 0.21$$

(4) Verteilung verschiedener Wurfotypen unter 27 Würfeln = 1.00

	Genotyp der Würfe mit Wildtyp und Mutante	Wildtyp allein	Mutante allein
Zahl der Würfe	12	2	13
Häufigkeiten	0.4 ₄	0.0 ₈	0.4 ₈

Fortsetzung der Tabelle

(5) Anzahl der Phagen in einzelnen Würfeln:

Würfe mit Wildtyp und Mutante		Wildtyp allein	Mutante allein
Wildtyp	Mutante		
64	15	1	105
81	17	150	39
34	133		2
77	44		1
70	22		212
187	23		2
323	72		90
8	113		28
136	100		65
231	27		87
82	102		127
13	125		265
Σ 1315	Σ 796		98

Fraktion des Wild-
typs in den Misch-
würfen 0.62

(6) Bevorzugter Strang: H

m-Wert berechnet, der die durchschnittliche Anzahl der Infektionszentren pro Platte angibt (3). Danach wird aus der Zahl der Misch-, der reinen Wildtyp- und der reinen Mutantenwürfe bezogen auf die Gesamtzahl der Würfe mit Phagen der Prozentsatz für jeden der drei möglichen Wurfotypen angegeben (4). Ebenso ist für jeden Phagenwurf die Wurfgröße der Wildtyp- und Mutantenphagen dargestellt, sowie die Fraktion des Wildtyps in den Mischwürfen der reziproken Heteroduplexkombinationen (5). Wie man sieht, treten in der Kombination schwerer Strang:Wildtyp / leichter Strang:Mutante mehr reine Wildtypwürfe, in der Kombination schwerer Strang:Mutante / leichter Strang:Wildtyp mehr reine Mutantenwürfe auf. In den reziproken Heteroduplexkombinationen treten bevorzugt reine Phagenwürfe mit dem Allel des schweren Stranges (H) auf (6) (siehe auch ausführliche Beschreibung des Konversionsmusters der Tabelle 15).

Eine Zusammenfassung der Konversionsdaten gibt die Tabelle 15 für 16 amber- und 5 temperatur-sensitive Mutanten. Die Mutanten sind entsprechend ihrer Reihenfolge auf der Genkarte von links nach rechts in der Tabelle angeordnet. Werte von nacheinander dargestellten Kombinationen resultieren aus mehreren Heteroduplexpräparationen ein und derselben DNA.

Für jedes Heteroduplexpaar sind zunächst die Summe der Häufigkeiten der Misch- und reinen Wildtypwürfe und die Häufigkeiten der reinen Mutantenwürfe als Infektionszentren wiedergegeben. Sodann sind die Häufigkeiten der drei möglichen Arten der Einzelwürfe aus dem Single Burst-Versuch dargestellt (mit Ausnahme der temperatur-sensitiven Mutante G 6). Bei mehreren Versuchen für ein Heteroduplex werden die Häufigkeiten der Würfe aus einzelnen Versuchen und der gewogene Mittelwert der Würfe mehrere Experimente angegeben. Ebenso ist für die Heteroduplexuntersuchung die Zahl der bestimmten Infektionszentren bzw. der Einzelwürfe sowie bei Single-Burst-Versuchen die durchschnittliche Zahl der Infektionszentren pro Platte aufgeführt. Weiterhin ist für jede Mutante das Konversionsschema wiedergegeben.

Tabelle 15: Konversion für Einzelmutanten.

Eine ausführliche Beschreibung der Tabelle wird im Text gegeben.

Genotyp der Heterodupljos		Häufigkeit von Infektionszentron bzw. Würfen			Zahl der untersuchten Infektionszentron bzw. Würfe	Infektionszentron pro Einzelwurf-platte	Konversions-sensitivität
H	L	Wildtyp und Mutante	Wildtyp allein	Mutante allein			
+	66		0,56	0,44	355		
66	+		0,74	0,26	102		
+	66		0,52	0,48	61		
66	+		0,82	0,18	185		
+	66		0,50	0,50	694		
66	+		0,75	0,25	86		
+	66		0,68	0,32	197		
66	+		0,92	0,08	389		
+	66	Σ	0,52	0,48	1307		
66	+	Σ	0,85	0,15	762		L/L
+	3	0,23	0,88	0,12	582		
			0,63	0,14	35	0,27	
3	+	0,31	0,86	0,14	641		
			0,51	0,18	51	0,45	
+	3	0,32	0,79	0,21	34		
			0,50	0,18	24	0,21	
3	+	0,58	0,81	0,19	123		
			0,32	0,10	38	0,31	
+	3	0,27	0,57	0,16	63		
3	+	0,43	0,43	0,14	89		H/L

Tabelle 15: Fortsetzung

Genotyp der Heteroduplices		Häufigkeit von Infektionszentren bzw. Würfen			Zahl der untersuchten Infektionszentren bzw. Würfe	Infektionszentren pro Einzelwurfplatte	Konversionschema
H	L	Wildtyp und Mutante	Wildtyp allein	Mutante allein			
+	am109		0.65	0.35	167		
		0.32	0.17	0.51	47	0.4	
	am109		0.30	0.70	37		
		0.20	0.19	0.61	59	0.53	
am109	+		0.19	0.81	185		
		0.17	0.13	0.70	63	0.58	
+	am109	0.32	0.17	0.51	47		L/H
		Σ 0.19	0.15	0.66	122		
+	I		0.96	0.04	602		
		0.46	0.42	0.12	59	0.54	
	I		0.58	0.42	436		
		0.28	0.07	0.65	23	0.16	
		0.44	0.08	0.48	27	0.21	
+	I	0.46	0.42	0.12	59		H/H
		Σ 0.38	0.06	0.56	50		

Tabelle 15: Fortsetzung

Genotyp der Heteroduplices		Häufigkeit von Infektionszentren bzw. Würfen			Zahl der untersuchten Infektionszentren bzw. Würfe	Infektionszentren pro Einzelwurfplatte	Konversions-schemata
H	L	Wildtyp und Mutante	Wildtyp allein	Mutante allein			
+	am99	0.89		0.11	78		
		0.56	0.30	0.14	61	0.56	H/H
	99	0.60		0.30	94		
		0.53	0.13	0.34	76	0.74	
+	am82	0.68		0.32	243		
		0.52	0.24	0.24	21	0.29	
	am82	0.58		0.42	43		
		0.32	0.26	0.42	19	0.29	
+	am82	0.54		0.46	359		
		0.265	0.265	0.47	15	0.29	
		0.34	0.26	0.40	15	0.10	
	am82	0.60		0.40	142		
		0.36	0.34	0.30	62	0.56	
+	am82	Σ 0.39	0.26	0.35	51		(LYH)
	am82	Σ 0.35	0.32	0.33	81		
+	35	0.75		0.25	647		
		0.25	0.42	0.33	12	0.15	
		0.26	0.48	0.26	66	0.61	
	35	0.72		0.28	960		
		0.24	0.47	0.29	70	0.29	

Tabelle 15: Fortsetzung

Genotyp der Heteroduplices		Häufigkeit von Infektionszentren bzw. Würfen			Zahl der untersuchten Infektionszentren bzw. Würfe	Infektionszentren pro Einzelwurfplatte	Konversions-schema
H	L	Wildtyp und Mutante	Wildtyp allein	Mutante allein			
+	35	Σ 0.26	0.47	0.27	78		H/L
	35	0.24	0.47	0.29	70		
+	am117	0.39		0.61	126		
		0.22	0.24	0.54	63	0.63	
	am117	0.31		0.69	227		
	+	0.27	0.20	0.53	66	0.61	
+	am117	0.35		0.65	292		
		0.18	0.08	0.74	61	0.54	
	am117	0.32		0.68	136		
	+	0.17	0.21	0.62	58	0.51	
+	am117	Σ 0.20	0.17	0.63	128		L/H
	am117	Σ 0.23	0.20	0.57	124		
+	am128	0.80		0.20	289		
		0.28	0.51	0.21	63	0.58	
	am128	0.75		0.25	272		
	+	0.33	0.30	0.37	46	0.79	
+	am128	0.62		0.38	307		
		0.28	0.34	0.38	32	0.25	
	am128	0.80		0.20	1248		
	+	0.37	0.21	0.42	19	0.14	

Tabelle 15 : Fortsetzung

Genotyp der Heteroduplices		Häufigkeit von Infektionszentren bzw. Würfen			Zahl der untersuchten Infektionszentren bzw. Würfe	Infektionszentren pro Einzelwurfplatte	Konversionsprozent
H	L	Wildtyp und Mutante	Wildtyp allein	Mutante allein			
+	am128	Σ 0.28	0.45	0.27	95		H/(H)
am128	+	Σ 0.34	0.27	0.39	65		
+	am102	0.84		0.16	268		H/H
		0.36	0.47	0.17	36	0.29	
am102	+	0.49		0.51	1418		
		0.38	0.18	0.44	63	0.58	
+	am124	0.04		0.96	161		
		0.05	0.18	0.77	60	0.29	
am124	+	0.56		0.44	239		
		0.24	0.28	0.48	50	0.45	
+	am124	0.20		0.80	54		
		0.12	0.00	0.88	95	1.22	
am124	+	0.58		0.42	43		
		0.36	0.19	0.45	62	0.48	
+	am124	Σ 0.09	0.07	0.84	130		L/H
am124	+	Σ 0.30	0.24	0.46	112		
+	am111	0.77		0.23	85		
		0.28	0.46	0.26	57	0.51	
am111	+	0.31		0.69	540		
		0.29	0.07	0.64	28	0.4	

Tabelle 15 : Fortsetzung

H	L	Häufigkeit von Infektionszentren bzw. Würfen			Zahl der untersuchten Infektionszentren bzw. Würfe	Infektionszentren pro Einzelwurfplatte	Konversions-schemata
		Wildtyp und Mutante	Wildtyp allein	Mutante allein			
+	am111	0.76		0.24	602		
		0.27	0.53	0.20	69	0.72	
		0.68		0.32	558		
		0.32	0.36	0.32	70	0.67	
+	am111	Σ 0.28	0.49	0.23	126		
		Σ 0.31	0.28	0.41	98		H/H
+	am112	0.89		0.11	106		
		0.01	0.87	0.12	60	0.5	
		0.38		0.62	143		
		0.19	0.22	0.59	68	0.67	
+	am112	0.34		0.66	169		
		0.15	0.23	0.62	39	1.03	
+	am112	Σ 0.01	0.87	0.12	60		
		Σ 0.18	0.22	0.60	107		H/H
+	ts40	0.96		0.04	203		
		0.40	0.51	0.09	45	0.39	
		0.39		0.61	275		
		0.27	0.25	0.48	48	0.40	H/H

Tabélie 15: Fortsetzung

H	L	Häufigkeit von Infektionszentren bzw. Würfen			Zahl der untersuchten Infektionszentren bzw. Würfe	Infektionszentren pro Einzelwurfplatte	Konversions-schemata
		Wildtyp und Mutante	Wildtyp allein	Mutante allein			
+	am126	0,86		0,14	303		
		0,16	0,75	0,09	56	0,5	
		0,44		0,56	27		
		0,06	0,27	0,67	15	0,1	
+	am126	0,80		0,20	50		
		0,10	0,74	0,16	68	0,65	
+	am126	0,99		0,01	264		
		0,13	0,76	0,11	70	0,68	
		0,56		0,44	151		
		0,19	0,39	0,42	91	0,54	
+	am126	Σ 0,13	0,75	0,12	194		
		Σ 0,18	0,37	0,45	108		H/(H)
+	am100	0,89		0,11	280		
		0,17	0,51	0,32	43	0,39	
+	am100	0,97		0,03	101		
		0,13	0,57	0,30	56	0,50	
		0,77		0,23	53		
		0,17	0,4	0,42	64	0,58	
+	am100	Σ 0,14	0,55	0,31	99		
		Σ 0,17	0,41	0,42	64		H/(H)

Tabelle 15 : Fortsetzung

Genotyp der Heteroduplices		Häufigkeit von Infektionszentren bzw. Würfen			Zahl der untersuchten Infektionszentren bzw. Würfe	Infektionszentren pro Einzelwurfplatte	Konversionschema
H	L	Wildtyp und Mutante	Wildtyp allein	Mutante allein			
+	am118	0.98		0.02	563		
		0.05	0.80	0.15	40	0.43	
		0.10	0.87	0.03	70	0.67	
am118	+	0.36		0.64	279		
		0.16	0.20	0.64	42	0.61	
		0.09	0.31	0.60	13	0.23	
+	am118	0.98		0.02	772		
		0.15	0.85	0.00	53	0.46	
+	am118	0.10	0.85	0.05	163		
		0.15	0.22	0.63	79		H/H
+	am114	0.85		0.15	352		
		0.22	0.59	0.18	32	0.25	
		0.26		0.74	102		H/H
am114	+	0.06	0.05	0.89	35	0.27	
+	am119	0.99		0.01	752		
		0.66	0.20	0.14	41	0.33	
		0.72		0.28	944		
am119	+	0.71	0.03	0.26	58	0.51	
+	am119	0.98		0.02	1333		
		0.68	0.30	0.02	75	0.72	
		0.57		0.43	70		
am119	+	0.29	0.24	0.47	45	0.48	

Wie aus der Tabelle 15 zu ersehen ist, stimmten in den meisten Heteroduplexpaaren die Häufigkeiten der Einzelwürfe aus Single Burst-Versuchen mit denen der Infektionszentren, die durch Plattierung transfizierter Zellen vor der Lyse bestimmt wurden, überein. Der Unterschied in der Häufigkeit reiner Mutantenwürfe aus dem Single Burst-Versuch und aus Infektionszentren bei einigen Mutanten war auf technische Gründe bei der Plattierung von Infektionszentren zurückzuführen. Verbindlich sind die Daten aus Single Burst-Versuchen.

Für die meisten Mutanten betrug die Reproduzierbarkeit der Häufigkeiten der Einzelwürfe bei gleicher Zahl der durchschnittlichen Infektionszentren 0,5 - 0,6 pro Platte von ca. 60 untersuchten Würfeln $\pm 15\%$. Streuungen in der Reproduzierbarkeit der Konversionsbestimmung waren einerseits in statistisch niedrigen Zahlen der Würfe, andererseits in der niedrigen Wurfgröße der Mutanten (um das Zehnfache niedriger als der Wildtyp) und in der Erkennbarkeit einiger Mutanten begründet. In diesen Fällen wurden nicht alle reinen Mutantenwürfe erkannt. Der Anteil reiner Wildtypwürfe erhöhte sich dadurch. Ebenso bewirkte das schlechtere Wachstumsvermögen der Mutante und die Ausbildung kleiner Mutantenplaques gegenüber dem Wildtyp in den Mischwürfen eine Reduzierung der Mischwürfe zugunsten einer erhöhten Zahl reiner Wildtypwürfe.

Aus den Ergebnissen der Tabelle 15 folgt:

1. Verteilung der Würfe

Für alle Mutanten werden in den beiden Heteroduplexkombinationen die drei möglichen Wurfotypen gefunden: Misch-, reine Wildtyp- und reine Mutantenwürfe. Die reinen Würfe zeigen die Konversion von Heteroduplex-DNA an.

2. Asymmetrie der reinen Würfe

Bei Betrachtung der reinen Würfe fällt die starke Asymmetrie in den Häufigkeiten reiner Wildtyp- und reiner Mutantenwürfe in einer gegebenen Kombination auf. Es wird derjenige Strang als "bevorzugter" Strang definiert, dessen Allel in reinen Würfeln mit einer um mindestens einen Faktor 2 größeren Häufigkeit als das Allel des komplementären Stranges vorkommt. Die bevorzugten Stränge, die mit H für den schweren, mit L für den leich-

ten Strang abgekürzt sind, der reziproken Heteroduplexkombinationen sind in dem Konversionsschema in der Tabelle 15 wiedergegeben.¹⁾

Die Strangbevorzugung gibt die Richtung der Konversion an.

Wenn sich Häufigkeiten reiner Würfe um weniger als einen Faktor von 2 unterscheiden, ergibt sich kein eindeutiges Konversionsmuster. Die bevorzugten Stränge sind dann in der Tabelle 15 in Klammern gesetzt. Für die Mutante G 6 wurden nur die Infektionszentren analysiert. Da sich hier die Häufigkeiten der reinen Mutantenwürfe in den reziproken Kombinationen um einen Faktor 2 voneinander unterscheiden, kann auch hier Strangspezifität ermittelt werden. Dieses Vorgehen war aus dem Vergleich mit den übrigen Mutanten, bei denen sich das aus Infektionszentren abgeleitete Konversionsmuster durch Single Burst-Daten bestätigen ließ, gerechtfertigt.

3. Richtung der Asymmetrie

Für die meisten Mutanten erfolgt Konversion in den reziproken Heteroduplexkombinationen bevorzugt zu demselben Strang. Überwiegend wird zum Genotyp des schweren Stranges konvertiert (Konversionsmuster: H/H). Konversion bei der temperatur-sensitiven Mutante G6 bevorzugt den leichten Strang. (Siehe Diskussion der Ergebnisse:Konversionsrichtung!)

4. Abweichende Konversionsmuster ("Marker-Effekte" einiger amber Mutanten)

Bei einigen Mutanten werden in den reziproken Heteroduplexkombinationen verschiedene Konversionsrichtungen beobachtet, d.h. in beiden Kombinationen tritt bevorzugt ein und derselbe Genotyp als Einzelwurf auf. Die temperatur-sensitiven Mutanten 3 und 35 zeigen überwiegende Konversion zum Wildtyp (Konversionsschema: H/L).

1) In dem Konversionsschema wird folgende Reihenfolge der Genotypen in den Heteroduplexkombinationen (1) und (2) eingehalten: (1) H: Wildtyp; L: Mutante (+/Mutante) und (2) H: Mutante; L: Wildtyp (Mutante/+). Wenn in (1) Wildtyp, in (2) Mutante bevorzugt auftritt, ergibt sich das Konversionsmuster H/H. Das Konversionsschema H/H bedeutet folglich, daß in beiden Heteroduplexkombinationen das Allel des schweren Stranges bevorzugt wird.

Einige amber-Mutanten (am 117, am 124, am 109, am 82) zeigen umgekehrt in beiden Heteroduplexkombinationen eine bevorzugte Konversion zum Genotyp der Mutante (Konversionsschema: L/H). In der Kombination (1) überwiegt das Mutantenallel des leichten Stranges, in der Kombination (2) das Mutantenallel des schweren Stranges. Während Konversion zum Wildtyp (Konversionsschema: H/L) möglicherweise sekundär durch einen Wachstumsvorteil des Wildtyps gegenüber der Mutante bedingt ist, liegen im Falle der Konversion zur Mutante (Konversionsschema: L/H) Effekte vor, die "Marker-Effekten" vergleichbar sind (siehe Diskussion der Ergebnisse: Konversionsrichtung!)

5. Korrelation der Konversion zur Genkarte

Der Anteil der Mischwürfe von der Gesamtzahl aller Würfe zeigt eine Beziehung zur Position der Mutanten auf der Genkarte. Mit zunehmender Entfernung von links nach rechts auf der Genkarte steigt die Häufigkeit der Mischwürfe bis zu einem Maximum (in der Nähe der Plaquetypmutante 516) und fällt dann allmählich ab (Abb. 7). Eine Abweichung von dieser Verteilung der Mischwürfe zeigt die amber-Mutante am 119. Obwohl am 119 am rechten Ende der Genkarte liegt, ist die Häufigkeit der Mischwürfe sehr hoch (siehe Diskussion der Ergebnisse: Verteilung des Konversionsmusters über der Genkarte!). Die Zusammenfassung aller Konversionsdaten zeigt für jede Mutante ein spezifisches Konversionsmuster. Die Tabelle 16 gibt eine Zusammenstellung der Konversionsmuster für die untersuchten Mutanten.

Konversionsschema	H/H	L/L	H/L	L/H	Summe
Typ der Mutanten					
amber	9(12) ²	0	0	1(4) ²	16
temperatur-sensitiv	2	1	2	0	5

Tabelle 16: Zusammenfassung der Konversionsmuster der untersuchten Mutanten

- 2) Für drei amber-Mutanten ist das H/H-Konversionsmuster und für drei weitere amber-Mutanten das L/H-Konversionsmuster nicht eindeutig ausgeprägt.

3.3.2 Konversionsrichtung

Konversion zeigt Strangbevorzugung in einer Richtung. Reziproke Heteroduplexkombinationen werden entweder zum Genotyp des schweren Stranges oder zum Genotyp des leichten Stranges konvertiert. Daneben wird in allen Heteroduplexen auch in geringerem Maße in nicht bevorzugter Richtung Konversion beobachtet.

Die Verteilung der Konversionsmuster zeigte, daß für alle amber-Mutanten und für die temperatur-sensitiven Mutanten 1 und 40 mit derselben Konversionsrichtung in einem Heteroduplexpaar Konversion bevorzugt zum Genotyp des schweren Stranges erfolgte (Konversionsschema: H/H). Für amber-Mutanten mit einem H/H-Konversionsschema sollte die Häufigkeit der reinen Wildtypwürfe aus der Kombination +/Mutante der Häufigkeit der reinen Mutantenwürfe aus der Kombination Mutante/+ entsprechen. Für einige amber-Mutanten war jedoch der Anteil reiner Mutantenwürfe aus der Kombination Mutante/+ niedriger als der der reinen Wildtypwürfe aus der reziproken Kombination +/Mutante (z.B. am 111, am 112, am 106). Diese Abweichung ist auf die niedrige Wurfgröße der amber-Mutanten, die im Durchschnitt um das 10 fache niedriger als die des Wildtyps liegt, zurückzuführen. Mit der extrem niedrigen Wurfgröße der Mutanten am 126 und am 100 (1-3) kann ebenfalls nicht eindeutige Bevorzugung der reinen Mutantenwürfe in der Kombination Mutante/+ gedeutet werden.

Unter Mutanten, bei denen in reziproken Heteroduplexkombinationen Konversion bevorzugt in gleicher Richtung erfolgte, wurden amber-Mutanten nur mit H/H-Konversionsmuster gefunden, während Plaquetypmutanten (Spatz und Trautner, 1970) und temperatur-sensitive Mutanten mit H/H- und L/L-Konversionsmuster beobachtet wurden.

Zwei temperatur-sensitive Mutanten 3 und 35 verhielten sich abweichend von diesem Konversionsschema. Sie zeigten in den reziproken Heteroduplexkombinationen ein Überwiegen von reinen Wildtypwürfen (Konversionsschema: H/L). Da die temperatur-sensitive Mutante 3 in reinen Mutantenwürfen nur eine

Wurfgröße von 2 hatte und das Verhältnis zwischen Mutanten und Wildtyp in den Mischwürfen 1 : 9 betrug, war das Konversionsschema H/L durch ein besseres Wachstumsvermögen des Wildtyps zu erklären. Für die temperatur-sensitive Mutante 35 betrug das Verhältnis zwischen Mutante und Wildtyp in den Mischwürfen 1 : 1,5. Ein Wachstumsvorteil des Wildtyps über die Mutante ist daher als Erklärung für das H/L-Konversionsmuster der Mutante ts 35 sehr wahrscheinlich. Einige Plaquetypmutanten zeigten in gleicher Weise eine Bevorzugung reiner Wildtypwürfe (Spatz und Trautner, 1970). Dieses Ergebnis wurde ebenfalls mit einem Selektionsvorteil des Wildtyps begründet.

Ein von dem bisher bekannten Konversionsmuster der Plaquetypmutanten abweichendes Schema der Konversion zeigten einige amber-Mutanten. Unabhängig von der Orientierung der Allele auf den Strängen traten in einem Heteroduplexpaar in beiden Kombinationen bevorzugt reine Mutantenwürfe auf. Dieser Effekt war eindeutig bei der amber-Mutante am 117, weniger ausgeprägt bei den Mutanten am 124 (siehe Reproduzierbarkeit!), am 109 und am 82.

"Marker-Effekte" dieser Art sind bedeutungsvoll für die Spezifität der Konversion. Um dieses Ergebnis absichern zu können, mußten technische Gründe ausgeschlossen werden. Es wurde geprüft, ob der Marker-Effekt dieser amber-Mutanten sekundär durch einen Selektionsvorteil der Mutante über den Wildtyp verursacht war. Hierzu wurden kompetente Zellen mit am 117- und Wildtyp-DNA gleicher Konzentration infiziert. Da die Plaquezahlen der Mutante und des Wildtyps aus mischinfizierten Zellen gleich waren, konnte hiermit ausgeschlossen werden, daß das Wachstum des Wildtyps durch die Mutante unterdrückt wurde. Weiterhin konnte aus dem Verhältnis der Mutante zum Wildtyp in den Mischwürfen gezeigt werden, daß die Zahl produzierter Phagen für den Wildtyp höher als für den amber-Genotyp am 117, am 109, am 82 lag. Außerdem war die Wurfgröße der reinen Mutantenwürfe um das 5 - 10 fache niedriger als die der reinen Wildtypwürfe. Die Konversionsrichtung zum Genotyp der Mutante war daher nicht durch die Unterdrückung des Wildtyps durch die Mutante bedingt, sondern eindeutig von der Mutante abhängig.

Um die Eindeutigkeit des Konversionsmusters L/H zu bestätigen, wurde die Reproduzierbarkeit überprüft. Hierzu wurden für zwei Heteroduplexpaare (am 117- und Wildtypallel; am 124- und Wildtypallel) die Häufigkeiten für die drei Arten von Würfen aus verschiedenen Heteroduplexpräparationen unter verschiedenen Plattierungsbedingungen in der Tabelle 17 miteinander verglichen. Die Zahlen kennzeichnen zwei verschiedene DNA-Ausgangslösungen, die Buchstaben die verschiedenen Heteroduplexpräparationen. Für (1) a und (1) b für am 117 und am 124 wurden MCB Su 3+ : 908-3 1 : 1 als Plattierungsbakterium und die Plattensorte LTT dp, NaCl benutzt. Für (2) c für am 117 und (1) c und (2) d für am 124 wurden MCB Su 3+ als Plattierungsbakterium und die Plattensorte NB verwendet.

Die Konversionsdaten für das Heteroduplexpaar von am 117 konnten in verschiedenen Heteroduplexpräparationen trotz unterschiedlicher biologischer Aktivität der Heteroduplexmoleküle und verschiedenen Plattierungsbedingungen bestätigt werden.

Für die amber-Mutante am 124 war die Reproduzierbarkeit der Konversionsdaten in der Kombination +/- am 124 eingeschränkt. Für diese Kombination wurde in den Heteroduplexpräparationen (1) a und (1) b ein Überwiegen reiner Mutantenwürfe von ca. 80 % beobachtet. Unter veränderten Plattierungsbedingungen wurden in (1) c und (2) d dagegen 50 % Mischwürfe erhalten. Die Häufigkeit der reinen Mutantenwürfe war auf ca. 25 % reduziert. In (1) c wurde für die Kombination +/- am 124 nur noch ein schwaches Überwiegen der reinen Mutantenwürfe beobachtet.

Auch die Variation der Konzentration von Heteroduplex-DNA blieb ohne Einfluß auf die Konversion von am 124 (siehe Tabelle 18).

Die Erkennbarkeit und die Wurfgröße der Mutante am 124 beeinflusste wahrscheinlich sehr empfindlich die Häufigkeiten der Würfe. Die Mutantenplaques waren in den Heteroduplexpräparationen (1) c, (2) d kleiner als in den Heteroduplexpräparationen (1) a und (1) b. Für (1) c und (2) d betrug in der Kombination +/- am 124 das Verhältnis der Wurfgrößen von reinen Mutanten- zu reinen Wildtypwürfen 1 : 10 bzw. 1 : 50 (Tab. 17). Im Gegensatz hierzu war die Wurfgröße der reinen Mutantenwürfe in (1) a und (1) b um das 10 - 30 fache höher als der Wildtyp (Tab. 17).

Ungeklärt blieb jedoch, wieso die schlechtere Erkennbarkeit und die reduzierte Wurfgröße der Mutanten nur die Häufigkeiten der Würfe in der Kombination +/- am 124 veränderte. Die Häufigkeiten der Würfe in der reziproken Kombination am 124/+ wurden nicht entscheidend durch verschiedene Plattierungsbedingungen beeinflusst.

Weitere Beispiele für Marker-Effekte bei der Konversion sind ausgeprägt für den Ascomyceten *Ascobolus* bekannt (Rossignol, 1969). In Kreuzungen verschiedener eng gekoppelter Mutanten im Gen "75" mit dem Wildtyp wurden für jede Mutante neben Tetraden mit normaler Aufspaltung 4 : 4 aberrante

Tabelle 17: Untersuchung der Reproduzierbarkeit von Konversionsdaten für Mutanten mit Marker-Effekten unter veränderten Plattierungsbedingungen.

Es sind die Häufigkeiten der Misch-, reinen Wildtyp- und reinen Mutantenwürfe der Einzelwürfe für verschiedene Heteroduplexpräparationen (a - d) ein und derselben DNA- oder verschiedener DNA-Ausgangslösungen (1) oder (2) unter zwei verschiedenen Plattierungsbedingungen aus einzelnen Versuchen und der gewogene Mittelwert der Würfe mehrerer Experimente wiedergegeben. Ebenfalls ist die Zahl der untersuchten Einzelwürfe, die durchschnittliche Zahl der Infektionszentren pro Platte und das Konversionsschema aufgeführt. Weiterhin sind die Infektionszentren, aus denen die biologische Aktivität der Heteroduplex-DNA ermittelt wird, sowie die Fraktion des Wildtyps in den Mischwürfen und die durchschnittliche Wurfgröße in den reinen Würfen des Wildtyps und der Mutante dargestellt.

Tabelle 1a: Einfluß der biologischen Aktivität auf die Konversion von
(2) a Hybride von aml24.

Genotyp der Heteroduplices		Verdünnung	Infektions- zentren [ml ⁻¹]	Anzahl der Infektionszentren		
H	L			Wildtyp und Mutante	Wildtyp allein	Mutante allein
+	aml24	1/1	1.7×10^4	0.81		0.19
+	aml24	1/4	3.1×10^3	0.80		0.20
aml24	+	1/1	9.5×10^4	0.57		0.43
aml24	+	1/4	5.8×10^3	0.56		0.44
aml24	+	1/10	8.0×10^2	0.59		0.41

Die Tabelle gibt die Häufigkeiten der Würfe als Infektionszentren nach Transfektion von + aml24- bzw. aml24 + - DNA bei verschiedener biologischer Aktivität an. Die biologische Aktivität wird durch die Zahl der Infektionszentren $\times \text{ml}^{-1}$ angegeben. Die Plattierungsbedingungen sind dieselben wie sie für Heteroduplexpräparationen (1) c und (2) a für aml24-Hybride in der Tabelle 1.7 benutzt wurden.

Tetraden hauptsächlich mit dem Zahlenverhältnis 2 : 6 (2 Mutanten- zu 6 Wildtypsporen) und 6 : 2 (6 Mutanten- zu 2 Wildtypsporen) gefunden. In einer Gruppe von Mutanten traten diese aberranten Tetraden mit gleicher Häufigkeit auf. Einige Mutanten zeigten ungleiche Häufigkeit für die aberranten Tetraden 2 : 6 und 6 : 2. Für die meisten Mutanten mit asymmetrischer Verteilung war die Häufigkeit der 2 : 6 Tetraden höher. Es erfolgte Konversion überwiegend zum Wildtyp. Für zwei Deletionsmutanten war dagegen die Häufigkeit der 2 : 6 Asci gegenüber 6 : 2 Asci reduziert. Diese Mutanten konvertierten überwiegend zur Mutante (6 : 2). Das asymmetrische Verhältnis der Konversion bei Deletionsmutanten war nicht von der Genposition abhängig, sondern war durch die Mutation bedingt.

3.3.3 Verteilung des Konversionsmusters über der Genkarte

Um festzustellen, ob eine Abhängigkeit der Konversionsrichtung von der Position der Mutante auf der Genkarte von SPP1 besteht, wurde die statistische Verteilung des Konversionsmusters für die erweiterte Zahl untersuchter Mutanten in Heteroduplexmolekülen untersucht. Aus der Verteilung des Konversionsschemas für amber-, temperatur-sensitive und Plaquetypmutanten über der Genkarte in der Abbildung 6 wurde ersichtlich, daß Strang.bevorzugung bei der Konversion eine Abhängigkeit zur Lage der Mutanten auf der Genkarte hatte.

Die Mutanten ließen sich in drei angrenzenden Regionen entsprechend der Verteilung des Konversionsmusters anordnen. Auf der rechten Hälfte der Genkarte ausgehend von der Mutante am 102 und in einem kleinen Bereich auf der linken Seite der Genkarte zwischen 515 und am 99 überwog bei der Konversion regelmäßig der Genotyp des schweren Stranges. Im zentralen Bereich der Genkarte erfolgte Konversion für Plaquetypmutanten im Gegensatz zu amber-Mutanten zum Allel des leichten Stranges. Die temperatur-sensitive Mutante G 6, die am linken Ende der Genkarte lag, konvertierte ebenfalls in den reziproken Heteroduplex zum Genotyp des leichten Stranges. Die vier amber-Mutanten mit L/H-Konversionsschema lagen im zentralen Bereich der Genkarte, jedoch befanden sich zwischen ihnen auch amber- und temperatur-sensitive Mutanten mit H/H-Konversionsschema wie am 99 und ts 1 rechts von am 109 und am 128 und am 102 zwischen am 117 und am 124. Weiterhin gibt es in einem und demselben Cistron Mutanten mit Markereffekt (am 117; am 124) und andere Mutanten, die H/H-Konversionsmuster zeigen. Mutanten, die bei der Konversion Marker-Effekte zeigen, sind also nicht in engen Regionen angeordnet.

3.3.4 Abhängigkeit der Mischwürfe von der Lage der Mutanten auf der Genkarte

Neben reinen Würfen treten nach Transfektion von Heteroduplexmolekülen Mischwürfe auf. Die Gegenwart von Mischwürfen läßt erkennen, daß eine

Abbildung 6: Das Konversionsschema für amber-, temperatur-sensitive und Plaquetypmutanten (Spatz und Trautner, 1970) ist in Abhängigkeit von der Lage der Mutanten auf der Genkarte wiedergegeben. Mutanten mit H/H-Konversionsmuster sind oberhalb, Mutanten mit L/L-Konversionsmuster unterhalb der Genkarte angeordnet. Mutanten mit L/H-Konversionsmuster sind unterstrichen und oberhalb sowie unterhalb der Genkarte aufgetragen. Für Mutanten, deren Konversionsmuster auf Grund eines selektiven Wachstumsvorteils des Wildtyps über der Mutante nicht eindeutig bestimmt werden konnte, sind durch eine gestrichelte Linie markiert (ts 3, ts 35 und die Plaquetypmutanten 520, NOH3). (Die Genpositionen von 510 und 520 wurden aus der relativen Lage gegenüber III auf der Genkarte von Spatz und Trautner (1971) übernommen).

Fraktion der Heteroduplexmoleküle nicht konvertiert wurde oder zwei Heteroduplexmoleküle in verschiedener Richtung konvertiert wurden.

Die Analyse verschiedener Heteroduplexmoleküle zeigte eine Abhängigkeit zwischen der Häufigkeit der Mischwürfe und der Lage der Mutanten auf der Genkarte (Abb. 7). Von der temperatur-sensitiven Mutante 3 ausgehend wurde entsprechend der Lage der Mutanten auf der Genkarte für die Häufigkeit der Mischwürfe erst ein kleiner Anstieg bis zur Plaquetypmutante 516 dann ein allmählicher Abfall von links nach rechts auf der Genkarte beobachtet.

Auffällig sind die Streuungen in den Häufigkeiten der Mischwürfe (Abb. 7). Sie erfolgen: 1. in vertikaler Richtung, d.h. in reziproken Heteroduplexkombinationen treten ungleiche Häufigkeiten der Mischwürfe auf, die eine unterschiedliche Differenz zu dem Mittelwert aus Mischwürfen reziproker Heteroduplexkombinationen aufweisen; 2. in horizontaler Richtung, d.h. es werden abweichende Häufigkeiten der Mischwürfe von den erwarteten Werten entsprechend bestimmten Positionen auf der Genkarte beobachtet. Die Schwankungen können auf technische Gründe wie niedrige Wurfgroße und Erkennbarkeit von Mutanten, die bereits bei der allgemeinen Beschreibung der Ergebnisse diskutiert wurden, zurückzuführen sein. Hiermit kann die relativ niedrige Anzahl der Mischwürfe und der hohe Prozentsatz der reinen Wildtypwürfe für die temperatur-sensitive Mutante 3 und besonders für die amber-Mutante am 112 erklärt werden. Für die Kombination +/am 112 wurde nur ein Prozent Mischwürfe beobachtet, die Anzahl reiner Wildtypwürfe betrug jedoch 80 %. Wie in der reziproken Kombination am 112/+ an sechs untersuchten Mischwürfen gezeigt werden konnte, betrug die Häufigkeit des Wildtyps in den Mischwürfen 97 %. Weiterhin können die unter Punkt 2 erwähnten Streuungen durch Schwankungen in der Reproduzierbarkeit der Rekombination bedingt sein. Es ist jedoch nicht ausgeschlossen, daß die Effizienz der Konversion für einen bestimmten Genotyp in reziproken Heteroduplexkombinationen nicht identisch ist.

Abbildung 7: Die Häufigkeit der Mischwürfe ist gegen die Position der Mutanten auf der Genkarte wiedergegeben. Die beiden Punkte für eine Mutante kennzeichnen die Häufigkeiten der Mischwürfe aus reziproken Heteroduplexkombinationen. Die Daten für Plaquetypmutanten (Spatz und Trautner, 1970) sind ebenfalls dargestellt.

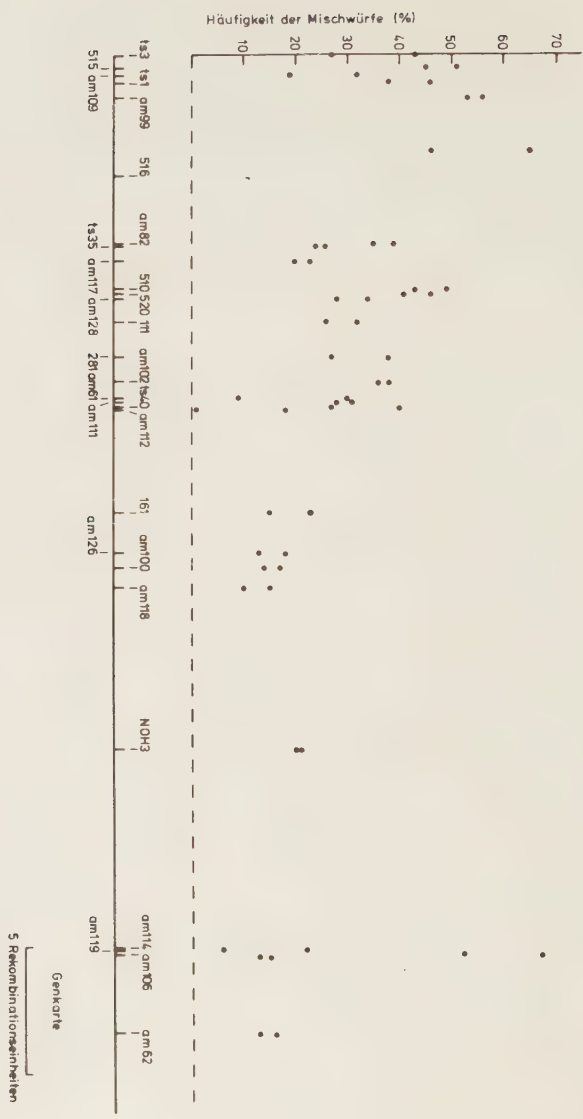


Abbildung 7:

Als Folge ausgeprägter Konversion lassen sich für die amber-Mutanten am 109 und am 117 die Häufigkeiten der Mischwürfe, die gegenüber den erwarteten Werten an diesen Genpositionen erniedrigt sind, deuten.

Eine Ausnahme von der Abhängigkeit zwischen Konversionshäufigkeiten und der Position der Mutante auf der Genkarte stellte die amber-Mutante am 119 dar. Obwohl diese Mutante weit rechts auf der Genkarte lag, war die Häufigkeit der Mischwürfe dennoch sehr hoch. Die Mutanten, die am 119 im gleichen Cistron eng benachbart waren, zeigten entsprechend ihrer Position auf der Genkarte die erwarteten niedrigen Prozentsätze an Mischwürfen. Hieraus folgt, daß die niedrige Konversionswahrscheinlichkeit für am 119 nicht durch ihre Position auf der Genkarte bedingt war.

Die Abhängigkeit, die zwischen Genposition und Konversionshäufigkeit beobachtet wurde, und ihre Interpretation soll in der Diskussion genauer erörtert werden.

4. Diskussion

4.1 Komplementation

Die im Zuge dieser Arbeit 25 beschriebenen amber-Mutanten ließen sich mit Hilfe des Komplementationstests in 9 Gruppen identischer Funktionen einteilen. Ebenso wurden die temperatur-sensitiven Mutanten ts 35 in das Cistron von am 82 und ts 31 in das Cistron von am 126 - am 118 eingeordnet. Die benachbarten Mutanten ts 3 und am 99 sowie ts 40 und am 102 - am 112 lagen in getrennten Cistronen. Insgesamt wurden also eindeutig 11 verschiedene Cistronen auf dem SPP1-Genom bestimmt. Die Eindeutigkeit des genetischen Komplementationstests konnte mit der begonnenen Analyse von Mutantenproteinen bestätigt werden (Esche, unveröffentlicht). Bei zwei verschiedenen amber-Mutanten, die auf Grund des Komplementationstestes einem Cistron angehörten, fehlten bei der Acrylamidgelelektrophorese von Mutanten infizierten Zellen identische Phagen codierte Proteinbanden.

Obwohl die übrigen 6 temperatur-sensitiven Mutanten von SPP1 nicht im Komplementationstest geprüft wurden, können diese auf Grund ihrer Position auf der Genkarte, die verschieden von den Mutanten bekannter Cistronen sind, weiteren Cistronen zugeordnet werden. Demnach können den amber- und temperatur-sensitiven Mutanten insgesamt 17 Cistronen zugeordnet werden. Möglicherweise wären mehr Gene bekannt geworden, wenn die als leaky erschienenen amber-Mutanten zur genetischen Charakterisierung mitbenutzt worden wären. Ebenso wird die zu erwartende größere Zahl von Genen aus der Analyse der von SPP1 ca. 35 codierten Proteine bestärkt (Esche, unveröffentlicht). Der Phage T 7 gleichen Molekulargewichts wie SPP1 ($2.6 \cdot 10^7$ Dalton) codiert 25 Proteine, denen verschiedene Mutanten aus 25 Genen zugeordnet werden konnten (Studier, 1972). Aus dem Vergleich der 11 genetisch definierten Cistronen und weiterer 6 für temperatur-sensitive Mutanten mit der Gesamtzahl von 35 Proteinen kann angenommen werden, daß etwa die Hälfte der möglichen Positionen von Genen, die für verschiedene Funktionen codieren, bekannt sind.

Bei Betrachtung nicht identischer Mutanten in 11 eindeutig genetisch definierten Cistronen waren 6 Cistronen durch eine Mutante, 2 Cistronen durch zwei Mutanten, 1 Cistron durch drei Mutanten und 2 Cistronen durch vier Mutanten charakterisiert. Möglicherweise spiegelt das Mutantenspektrum in den Cistronen die zufällsmäßige Verteilung der Mutationen in den 35 angenommenen Cistronen wieder. Für die Komplementationsgruppe 5, die an zwei Positionen mehrere identische Mutanten (siehe Genkarte, Abb. 5) enthält, wäre es vorstellbar, daß es sich hier um bevorzugt mutierbare Stellen ("hot spots", Benzer, 1961) handelt.

4.2 Rekombination

Die Kreuzungsergebnisse mit konditional letalen (amber- und temperatur-sensitive Mutanten) und Plaquetypmutanten haben zu der Anordnung der amber-Mutanten in einer linearen Genkarte geführt. Dieses Ergebnis stimmt mit dem physikalischen Nachweis der nicht zirkular permutierten DNA-Struktur von SPP1, der aus der Bestimmung eines definierten zentralen Bruchpunktes auf dem SPP1-Genom gewonnen wurde, überein (Klotz, 1973). Ebenso folgt aus der Hybridisierbarkeit denaturierter DNA-Einzelstränge zu biologisch aktiver doppelsträngiger DNA eine lineare Genanordnung.

Bei gekoppelten Genen sind Rekombinantenprozentsätze bis zu 2,5 % Wildtyp dem Genabstand proportional. Abweichungen der Rekombinationswerte, in identischen Kreuzungen waren auf unterschiedliche Wurfgröße und Erkennbarkeit einiger amber-Mutanten sowie auf das unterschiedliche Verhältnis des Wildtyps auf permissiven zu nicht permissiven Wirt zurückzuführen. Trotz dieser Schwankungen führten Rekombinationswerte in dem Bereich, wo Additivität gilt, zu einer eindeutigen Anordnung der Mutanten (Abb. 5b). In dem Maße, in dem Mehrfach austausche zwischen weiter auseinanderliegenden Genen auftreten, sind Rekombinationswerte nicht mehr additiv. Schließlich wird mit größeren Genabständen ein Sättigungsbereich erreicht, in dem geradzahlige und ungradzahlige Austauschereignisse gleich wahrscheinlich sind. Es wird ein Grenzwert von 50 % Rekombinanten unabhängig von den Genabständen erreicht. Für SPP1 betrugen die Sättigungswerte der Rekombi-

nanten 10 - 18 % Wildtyp. Genabstände können in diesem Bereich nicht mehr genau bestimmt werden.

Kontrollkreuzungen mit temperatur-sensitiven und Plaquetypmutanten zeigten Übereinstimmung in der relativen Anordnung mit der Genkarte von Spatz und Trautner (1971). Diese Genkarte, die aus Rekombinationshäufigkeiten von Kreuzungen zwischen temperatur-sensitiven und Plaquetypmutanten ermittelt wurde, war 2 x 22 Rekombinationseinheiten lang (Spatz und Trautner, 1971). Aus der größeren Gesamtzahl von Mutanten, die sich durch die Isolierung von amber-Mutanten ergab, wird aus der Kumulation der kleinsten Genabstände eine Länge der Genkarte von 2 x 49 Rekombinationseinheiten für das SPPI-Genom ermittelt. Da die Genkarte auch nicht additive Genabstände (zwischen ts G 6 und ts 3, zwischen am 118 und NOH3 und zwischen NOH3 und am 114) einschließt, gibt die Genkarte die Minimallänge an.

Weiterhin ermöglichten intracistronische Kreuzungen Feinstrukturanalyse von Cistronen. Für das Cistron am 82 - ts 35 wurde eine Minimallänge von 0,08 % Wildtyprekombinanten, für das Cistron ts 31 - am 118 eine Maximallänge von 1,6 % Wildtyprekombinanten ermittelt. Wie die Tabellen 7 - 11 und die Abb. 5 a zeigen, liegen die Sättigungswerte der Rekombination zwischen 10 und 18 % Wildtyprekombinanten. Der theoretische Maximumswert sollte jedoch 25 % Wildtyprekombinanten betragen. Abweichungen von diesem Wert können dadurch bedingt sein, daß einige Bakterien nur von einem Parentaltyp infiziert wurden und somit der Anteil mischinfizierter Zellen reduziert war. Ebenso könnten populationsgenetische Faktoren wie niedrige Paarungshäufigkeit vollständiger vegetativer Phagen oder Reifung von Phagen aus dem Pool zu einer Zeit, wo genetisches Gleichgewicht noch nicht erreicht ist, erniedrigte Sättigungswerte bedingen (Visconti und Delbrück, 1953).

An der Genomlänge fällt die ungleichmäßige Verteilung von Markern pro Genomlänge auf. Zu den Enden hin nehmen die Genabstände zu (Abb. 5 b). Diese Beobachtung könnte zweierlei Gründe haben:

- a) Die DNA an den Enden des Genoms enthält kaum Information für Proteine oder nur für solche, in denen selten temperatur-sensitive oder amber-Mutanten gefunden werden, und die Rekombinationswahrscheinlichkeit ist über das Genom konstant.
- b) Die Rekombinationshäufigkeit pro DNA-Längeneinheit ist bei gleichmäßiger Verteilung der Mutanten in der Mitte des Genoms höher.

Zur endgültigen Entscheidung hierüber sind weitere Mutanten auf der Genkarte erforderlich. Es besteht jedoch größere Wahrscheinlichkeit, daß b) zutrifft. Es sind Fälle bekannt, wo Rekombinationswahrscheinlichkeiten an den Enden des Genoms höher als in der Mitte lagen. So wurde in Kreuzungen für T 1 (Michalke, 1967) an den Enden des Genoms erhöhte Rekombinationshäufigkeiten beobachtet, ebenso für T 4 (Mosig et al., 1971) zwischen Partikeln mit unvollständigem Chromosom oder mit unvollständigem und vollständigem Chromosom. Weiterhin konnte für T 1 gezeigt werden, daß im Marker-Rescue-Experiment nach Kreuzungen zwischen mit Röntgenstrahlen beschädigten und unbeschädigten Phagen die Häufigkeit des Markerüberlebens durch Rekombination für Marker zu den Enden des Genoms hin zunahm. Ausgehend von der Annahme, daß Heterozygotie bei der Bildung von Rekombinanten notwendigerweise vorkommt und deshalb als Maß für die Rekombinationshäufigkeit dienen kann, wurden die Heterozygotenhäufigkeiten entlang der T 1 - Genkarte gemessen. Die Häufigkeit an Heterozygoten war für Marker an den Enden höher als für Marker in der Mitte des Genoms.

Rekombinationsheterozygoten wurden bei SPPI nicht beobachtet. Dieses Ergebnis war nicht durch die Erkennbarkeit bedingt. Wenn nämlich mischinfizierte Zellen für verschiedene Mutanten vor der Lysis plattiert wurden, waren Plaques, die verschiedene Genotypen enthielten, zu erkennen.

Die Frage, ob eine Proportionalität zwischen verschiedenen Rekombinationshäufigkeiten und der Genomlänge besteht, könnte mit physiko-chemischen Untersuchungen an rekombinanter DNA nach Kreuzung dichter-markierter Marker sowohl aus dem mittleren wie aus dem terminalen Bereich des SPPI-Genoms eindeutig geprüft werden. Abweichende hohe Rekombinationshäufigkeiten wurden in der Kombination zwischen amber-Mutanten aus dem Cistron am 102 - am 112 und der temperatur-sensitiven Mutante ts 40 beobachtet. Eine Deutung ist ohne weitere Dreifaktorkreuzungen mit anderen Mutanten nicht möglich.

Vergleichbare "Marker-Effekte" der Rekombination wurden bei der Rekombination bei P 1-Transduktion beobachtet (Kemper, 1970). Zwischen einer amber-Mutante im Transferasegen des Galaktose-Operons und anderen Galaktose-Mutanten wurden 2 - 10 fache höhere Rekombinationswerte als mit einer benachbarten Suppressor unempfindlichen Mutante gefunden. Es wird vermutet, daß hier der Abbruch der Translation bei amber-Mutanten die m-RNA-Synthese verzögern könnte. Bis zum Start der m-RNA für das nächste Polypeptid wäre die DNA an dieser Position enzymatisch leichter angreifbar. Rekombination könnte daher hier häufiger auftreten. Allerdings ist diese Erklärungsmöglichkeit nicht auf SPPI übertragbar, da "Marker-Effekte" nur in der Kombination zwischen ts 40 und amber-Mutanten aus dem Cistron am 102 - am 112 beobachtet wurden. Es sollten jedoch Kreuzungen mit anderen amber-Mutanten ebenfalls Marker-Effekte zeigen.

Eine andere Deutung für Marker-Effekte wäre die Korrektur von Heteroduplex-DNA im Zuge der Rekombination (Kemper, 1970). Ebenfalls wurden Marker-Effekte in Kreuzungen einiger nonsense- und missense-Mutanten aus dem Lac-Operon von *E. coli* mit Korrektur von nicht komplementär gepaarten Regionen gedeutet (Norkin, 1970). So wurde beobachtet, daß zwei unabhängige nonsense-Mutanten, die jedoch von demselben Suppressor supprimiert wurden, in Kreuzungen mit denselben Hfr-Stämmen Abweichungen voneinander in den Rekombinationshäufigkeiten zeigten. Dieses Ergebnis wurde mit einem Einfluß der Korrektur von zusätzlichen Basensub-

stitutionen, die nicht phänotypisch als Mutation in Erscheinung treten, in der Heteroduplexregion interpretiert. Für SPP1 gibt es jedoch keinen Hinweis für ungewöhnliche Korrektur von ts 40-Heteroduplex-DNA im Laufe der Rekombination.

4.3 Konversion

Der wesentliche Teil dieser Arbeit bestand in der Bestimmung des Konversionsverhaltens von Heteroduplexmolekülen, die mit amber- oder temperatur-sensitiven Mutanten- und Wildtypallel markiert waren. Zusammen mit den Ergebnissen für Heteroduplexmoleküle mit Plaquetypmutanten (Spatz und Trautner, 1970) und mit Deletionsmutanten (Trautner et al., 1972) können aus der größeren Gesamtzahl untersuchter Heteroduplexmoleküle für verschiedene Mutationstypen allgemeine Gesetzmäßigkeiten für die Konversion abgeleitet werden.

Die genetische Analyse der Phagennachkommen aus Heteroduplex transfizierten Zellen zeigte, daß ein Reparaturmechanismus für amber- und temperatur-sensitive Mutanten ähnlich wie für Plaquetypmutanten wirksam ist, der Heteroduplices zu Homoduplices konvertiert. In der Tabelle 16 auf der Seite 67 sind die Konversionsmuster der untersuchten Mutanten zusammengefaßt. In den folgenden Abschnitten werden diese Konversionsergebnisse genauer diskutiert. Trotz Schwankungen, die entweder durch die niedrige Wurfrgröße oder durch die Erkennbarkeit der amber-Mutanten bedingt waren, konnte das Konversionsmuster der Heteroduplexpaare weitgehend reproduziert werden (eingeschränkt für die Kombination +/am 124).

4.3.1 Verteilung der Konversionsrichtung

In allen Heteroduplices erfolgte Konversion in bevorzugter Richtung und in geringerem Maße auch in nicht bevorzugter Richtung. Überwiegend konvertierten amber-, sowie temperatur-sensitive Mutanten in reziproken Heteroduplexkombinationen zum Genotyp des schweren Stranges (H/H-Konversionsmuster). H/H-Konversionsmuster wurde ebenfalls am häufigsten für Plaquetypmutanten (Spatz und Trautner, 1970) und für einige Deletionsmutanten (Trautner et al., 1972) gezeigt. Es wurde keine amber-Mutante mit einem L/L-Konversionsmuster gefunden wie es für einige Plaquetypmutanten beobachtet wurde (Spatz und Trautner, 1970).

Es wäre möglich, daß das bevorzugte H/H-Konversionsmuster bei allen untersuchten Mutanten im Zusammenhang mit dem Transkriptionsmuster von SPP1 steht. So wurde in vivo für SPP1 nachgewiesen, daß während der Phagenentwicklung überwiegend am schweren Strang transkribiert wird (Esche und Spatz, im Druck). Demnach könnte der codogene Strang für die Transkription auch der bevorzugte Strang bei der Konversion sein. Da jedoch in Heteroduplexkombinationen mit bevorzugter Konversionsrichtung zum schweren Strang auch am komplementären leichten Strang zwischen 5 - 30 % für verschiedene Mutanten Konversion erfolgt, besteht kein absoluter Zusammenhang zwischen der Konversions- und der Transkriptionsrichtung.

4.3.2 "Clustering"

Wie aus der Abbildung 6 auf Seite 70 ersichtlich ist, können die Mutanten in Hinblick ihrer Position auf der Genkarte drei angrenzenden Gruppen identischer Konversionsmuster zugeordnet werden. Plaquetyp-mutanten konvertierten in der zentralen Region der Genkarte in reziproken Heteroduplexkombinationen vorwiegend zum Genotyp des leichten Stranges, in den angrenzenden Regionen rechts und links auf der Genkarte zum schweren Strang. Für amber-Mutanten wurde keine deutliche Beziehung zwischen Position der Mutante auf der Genkarte und Konversionsrichtung beobachtet. Die temperatur-sensitive Mutante G 6, die am linken Ende der Genkarte liegt, zeigte ein L/L-Konversionsmuster. Vielleicht gibt es in der Nähe von ts G 6 noch eine weitere vierte Region mit bevorzugter Konversion zum leichten Strang. Es sind jedoch Konversionsuntersuchungen weiterer Mutanten in diesem Genabschnitt abzuwarten, ob diese ebenfalls nach dem L/L-Konversionsmuster repariert werden. Hierzu müßten zunächst weitere Mutanten isoliert und in der Nähe von ts G 6 genetisch lokalisiert werden.

Aus den Gruppierungen identischer Konversionsmuster in angrenzenden Regionen kann vermutet werden, daß Transkription, die Strangspezifität zeigt, auch eine Rolle bei der Konversion spielt. So zeigte die in vivo Untersuchung des Transkriptionsmusters von SPPI, daß sehr früh und sehr spät nach Phageninfektion weitgehend Transkription am schweren Strang, während in der späten Phagenentwicklung 50 % der m-RNA am leichten Strang transkribiert wurde (Esche und Spatz, im Druck). Man könnte spekulieren, daß die Region, wo das L/L-Konversionsmuster gilt, der Bereich ist, in dem am leichten Strang transkribiert wird.

Ähnlich wie für die Konversion besteht bei Rekombination in der Transduktion ein Zusammenhang zur Transkription. So wurde die erhöhte Häufigkeit von Transduktanten aus intragener Rekombination nach Induktion des Arabinose-Operons bei *E. coli* mit der Transkription von m-RNA des Arabinose-Operons in Verbindung gebracht (Helling, 1967). Weiterhin lassen Daten, die bei Rekombination in der Transduktion für Gal^+ durch (λ -gal) T 1 gewonnen wurden, vermuten, daß Transduktion und Transkription der DNA von (λ -gal) T 1 durch dieselben λ -Gene in paralleler Weise kontrolliert werden (Drexler, 1972).

4.3.3 Mechanismus

4.3.3.1 Beziehung der Konversion zur DNA-Replikation

Nach Transfektion von Heteroduplexmolekülen treten Würfe auf, die beide Phagentypen des Heteroduplex enthalten. Die Gegenwart von Mischwürfen läßt erkennen, daß Konversion von Heteroduplex-DNA nicht mit hundertprozentiger Effizienz funktioniert. Einige der Heteroduplexmoleküle werden demnach repliziert, ohne daß Konversion erfolgt. Die Verteilung der Mischwürfe in den verschiedenen Heteroduplexmolekülen über der Genkarte zeigte, daß ausgehend von der Plaquetypmutante 516 die Häufigkeit

der Mischwürfe von links nach rechts in Richtung der Mutante am 62 und von rechts nach links für die kleine genetisch bekannte Region in Richtung der Mutante ts 3 abnahm (Abb. 7). Wie für amber- und temperatur-sensitive Mutanten wurde ebenfalls für Plaquetypmutanten eine Korrelation zwischen abnehmender Häufigkeit der Mischwürfe und der Position der Mutante auf der Genkarte von links nach rechts beobachtet (Spatz und Trautner, 1970). Die abnehmende Häufigkeit der Mischwürfe in Heteroduplexmolekülen in bestimmter Richtung auf der Genkarte kann mit einem Zusammenwirken von unabhängigen, aber konkurrierenden Prozessen der gerichteten Replikation und der zufälligen Konversion gedeutet werden. Heteroduplexregionen in der Nähe des Replikationspunktes haben eine größere Wahrscheinlichkeit, vor der Konversion repliziert zu werden und produzieren daher eine höhere Anzahl von Mischwürfen als Heteroduplexregionen distal zum Replikationspunkt. Weiterhin wurde durch die Hemmung der DNA-Synthese durch FUDR in Heteroduplex transfizierten Zellen gezeigt, daß Heteroduplexmoleküle vor der Replikation konvertiert werden können (Spatz und Trautner, 1970). Unter solchen Bedingungen verkleinerte sich der Anteil der Mischwürfe um das 2 - 3 fache zugunsten korrigierter reiner Würfe.

Weiterhin können aus dem Gradienten für die Konversion von Heteroduplex- zu Homoduplexmolekülen Schlüsse auf den Replikationspunkt und die Richtung der Replikation gezogen werden.

Streuungen in den Häufigkeiten der Mischwürfe können durch technische Gründe bedingt sein (siehe Ergebnisse, Seite 78). Ebenso übt die Konversion einen Einfluß auf die Häufigkeit der Mischwürfe aus (siehe Ergebnisse, Seite 81). Trotz dieser Schwankungen wurde ein Gradient abnehmender Häufigkeit der Mischwürfe in Heteroduplexen deutlich in Richtung der Mutante am 62 beobachtet. Dieses Ergebnis kann damit interpretiert werden, daß bei dem Phagen SPPI die Replikation von einem definierten Replikationspunkt in der Nähe der Plaquetypmutante 516 beginnt und von links nach rechts auf der Genkarte läuft. Ebenso wurde aus der Korrelation

zwischen der Häufigkeit der Mischwürfe und der Genposition von Plaquetypmutanten von SPP1 auf eine Replikationsrichtung von links nach rechts auf der Genkarte ausgehend von einem definierten Replikationspunkt geschlossen (Spatz und Trautner, 1970). Dieser indirekte Nachweis des definierten Replikationspunktes und der gerichteten Replikation konnte ebenfalls durch andere Methoden bestätigt werden (Klotz, 1973). Es wurden Phagen-DNA zu verschiedenen Zeiten nach Transfektion aus SPP1 transfizierten Zellen isoliert. Im Marker-Rescue-System wurde die Allelfrequenz verschiedener temperatur-sensitiver Mutanten gemessen. Hierbei ergab sich ein Häufigkeitsgradient, der Replikationsrichtung von links nach rechts zeigte.

Mit der größeren Zahl untersuchter Mutanten in Heteroduplices wurde jedoch in schwächerem Maße auch ein Gradient abnehmender Häufigkeit der Mischwürfe ausgehend von der Plaquetypmutante 516 in umgekehrter Richtung von rechts nach links beobachtet. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß bei dem Phagen SPP1 die Replikation von einem definierten Replikationspunkt in der Nähe der Plaquetypmutante 516 beginnt und nicht nur in einer Richtung, sondern möglicherweise in zwei Richtungen läuft. Bei dem Phagen λ (Inman, 1971), T 7 (Dressler et al., 1972) und den Bakterien *B. subtilis* (Wake, 1972) und *E. coli* (Masters und Broda, 1971; Hohlfeld und Vielmetter, 1973) konnten ebenfalls mit verschiedenen Methoden bidirektionale Replikation nachgewiesen werden.

4.3.3.2 Molekularmechanismus

Konversion eines Heteroduplexmoleküls könnte durch zwei prinzipiell verschiedene Mechanismen bewirkt werden:

- 1) Konversion entsteht durch unspezifische DNA-Replikation als Nebenprodukt bei der Transfektion oder bei der Rekombination und wird nicht durch die Heteroduplexregion induziert.

2) Konversion erfolgt nach spezifischer Erkennung und Entfernung des nicht komplementären Basenpaares entsprechend dem Whitehouse-Holliday-Modell.

Es sollen zunächst die unter 1) erwähnten Möglichkeiten, die Konversion induzieren könnten, betrachtet werden.

Es wird bei der Transfektion angenommen, daß DNA-Moleküle, die durch größere als lineare Dosisabhängigkeit charakterisiert sind, wie z.B. SPP1-DNA intrazellulär "Läsionen" erhalten (Green, 1966). Um das unterschiedliche Konversionsmuster (H/H, L/L und L/H) für verschiedene Mutanten erklären zu können, müßte angenommen werden, daß DNA-Moleküle nach Aufnahme in die Bakterienzelle nicht zufällig, sondern an spezifischen Positionen des schweren und des leichten DNA-Stranges Läsionen enthalten. Weiterhin betrug die Konversionshäufigkeit für Heteroduplex-moleküle zwischen 30 und 80 %. Der DNA-Abbau und die anschließende Reparatursynthese müßte demnach sehr ausgedehnt und sehr spezifisch erfolgen.

Weiterhin haben Untersuchungen an verschiedenen Phagen wie SP 50, SPP1 (Spatz und Trautner, 1971) und SP 82 G (Green und Urban, 1972) gezeigt, daß Rekombination vor der Replikation bei der Transfektion erfolgen muß. Es wäre daher vorstellbar, daß Heteroduplex-Reparatur als Folge obligatorischer Rekombination nach dem Boon-Zinder-Modell entsteht. Das Boon-Zinder-Modell erfordert in einem Rekombinationsereignis an komplementären DNA-Strängen ausgedehnte DNA-Synthese (Boon und Zinder, 1969). Diese Hypothese gibt jedoch keine ausreichende Erklärung für die Spezifität der Konversion.

Mit dem folgenden Experiment, in dem die Reparatursynthese von DNA während der Primärrekombination, d.h. Rekombination vor der Replikation bei der Transfektion bestimmt wurde, konnte DNA-Synthese bei Transfektion und Rekombination als Erklärung für die Konversion ausgeschlossen werden

(Schlaeger, unveröffentlicht): Es wurden kompetente Zellen von *B. subtilis* in "leichtem" Medium mit "schwer" markierter DNA (^{15}N , ^{13}C) zweier Mutanten von SPP1 transfiziert, die Zellen aufgebrochen und die DNA reisoliert. Das Ausmaß der Reparatursynthese wurde in einem CsCl-Dichtegradienten durch die Dichterverschiebung unreplizierter rekombinanter DNA gemessen. Die "Marker-rescue"-Methode erlaubte die spezifische Bestimmung parentaler und rekombinanter DNA. Die Reparatursynthese bei Transfektion betrug weniger als 5 %. Unter den gleichen Bedingungen wird aber Genkonversion mit einer Effizienz bis zu 80 % beobachtet. Hieraus wird deutlich, daß Konversion von Heteroduplexen nicht durch eine unspezifische Reparatursynthese erklärt werden kann. Weiterhin wurde mit der geringen DNA-Synthese das Rekombinationsmodell nach Boon und Zinder für die Primärrekombination bei Transfektion ausgeschlossen.

Experimente mit FUDR behandelten Zellen zeigten ebenfalls, daß Konversion ohne ausgedehnte Replikation erfolgt (Spatz und Trautner, 1970). Es ist daher sehr wahrscheinlich, daß Konversion als Folge spezifischer Korrektur des Heteroduplex erfolgt. Diese Vermutung wird besonders durch Ergebnisse der Konversion von amber-Mutanten mit Marker-Effekten und durch die Markerspezifität von Deletionsmutanten bestärkt. Nach dem Holliday-Whitehouse-Modell (Holliday, 1968; Whitehouse, 1970) treten während der Rekombination Brüche an rekombinierenden Doppelsträngen der DNA auf. Es erfolgt Basenpaarung zwischen komplementären Einzelstrangabschnitten. Wenn sich die gepaarten Stränge in ihrem Genotyp unterscheiden, ist eine Heteroduplex-Region entstanden. Diese Heteroduplex-Region kann durch einen Reparaturmechanismus zu einem Homoduplex konvertiert werden.

Analog zu den experimentellen Befunden zur Beseitigung von UV-Schäden an der DNA von Bakterien könnten ähnliche Enzyme bei der Konversion von Heteroduplex-DNA wirksam sein. Bei Bakterien ist die enzymatische Reparatur von UV induzierten Thymindimeren eingehend untersucht worden

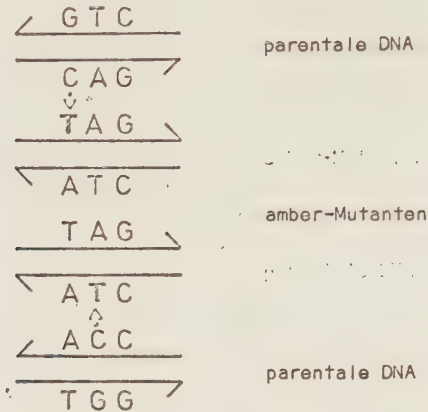
(Howard-Flanders, 1968). Diese UV-Läsion wird durch eine Endonuklease erkannt und in der Nähe des Thymindimers wird der entsprechende DNA-Einzelstrang eingeschnitten. Der DNA-Abschnitt mit der Einschnittsstelle wird dann durch eine Exonuklease entfernt. Diese Lücke wird entsprechend dem Template des unzerstörten Stranges durch Resynthese von DNA durch Polymerase aufgefüllt. Das synthetisierte Material wird mit Hilfe einer Ligase mit dem übrigen DNA-Strang verknüpft.

Wenn ein ähnlicher Mechanismus bei der Konversion von Heteroduplexregionen existiert (siehe auch Bressler et al., 1968), sollten ähnliche Enzyme vorhanden sein.

Um die Uniformität der Heteroduplexregionen zu zeigen, sollen zunächst die verschiedenen Kombinationsmöglichkeiten für ein Heteroduplexmolekül zwischen amber- und Wildtypgenotyp dargestellt werden. Ein Heteroduplex entsteht hierbei an der Position, die durch eine mutierte Base im Basentriplett für amber-Mutanten definiert ist. Amber-Mutanten tragen in ihrer m-RNA das Anticodon pUAG, dem in ihrer DNA das Basentriplett pTAG mit den komplementären Basen pCTA entspricht. Alle amber-Mutanten wurden durch Hydroxylamin induziert. Da Hydroxylamin durch Veränderung von Cytosin Transitionen von $\begin{smallmatrix} G \\ C \end{smallmatrix} \rightarrow \begin{smallmatrix} A \\ T \end{smallmatrix}$ bewirkt, kann das Mutagen symmetrisch am schweren wie am leichten DNA-Strang eines der beiden ersten Basenpaare zu einem amber-Triplett verändern, nämlich $CAG \rightarrow TAG$ und $CCA \rightarrow CTA$. Somit ergeben sich für die Bildung des Heteroduplexmoleküls 4 verschiedene Kombinationen (Abb. 8).

Es soll nun der mögliche Korrekturmechanismus bei der Konversion am Beispiel des Heteroduplexmoleküls mit einem GT Basenpaar dargestellt werden (Abb. 9). In einem Heteroduplex ist zwischen komplementären Einzelsträngen keine Basenpaarung möglich (1). Geeignete Enzyme erkennen den Fehler und schneiden an spezifischen Positionen, die ungleich auf dem schweren und leichten Strang verteilt sind, einen der beiden Einzelstränge entfernt von dem nicht komplementären Basenpaar ein. Anschließend wird eine Anzahl

- 1.) Entstehung der amber-Mutation durch Mutagenese mit Hydroxylamin an Strängen verschiedener Polarität (pCAG → pTAG oder pCCA → pCTA). Der Pfeil markiert das 3' Ende eines Stranges.



Basen, die durch Mutationen entstanden sind, sind stärker gezeichnet.

- 2.) Kombinationen der Heteroduplexmoleküle aus komplementären amber-Mutanten- und Wildtypeinzelsträngen.

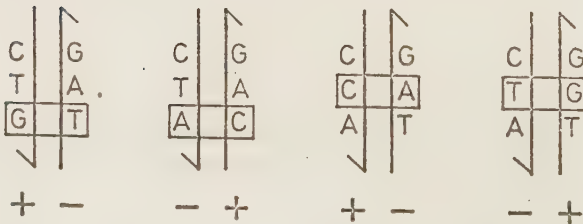


Abbildung 8: Schema der durch Hydroxylamin induzierten amber-Mutanten und deren Kombinationsmöglichkeiten mit Wildtyp in Heteroduplexen.

Die Pfeilrichtung gibt die Polarität der Stränge wieder. Der Pfeil markiert das 3' Ende eines Stranges. Mutantenstrang ist mit -, Wildtypstrang mit + markiert. Nicht komplementäre Basenpaare sind umrahmt.

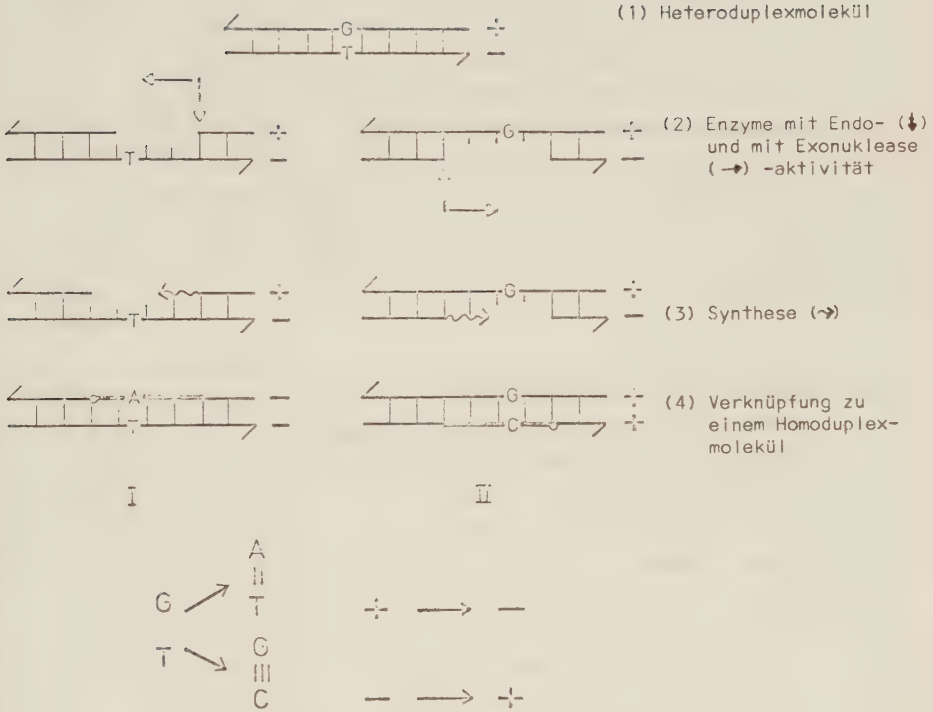


Abbildung 9: Schema der Konversion vom Heteroduplex-DNA

Die Pfeilrichtung nach rechts oder links gibt die Polarität der Stränge an. Der Pfeil markiert das 3' Ende eines Stranges.

von Nukleotiden zusammen mit den nicht passenden Nukleotid des Heteroduplex entfernt (2). Sodann erfolgt Resynthese des zerstörten DNA-Strangfragments mit passenden Nukleotiden, wobei der unzerstörte komplementäre Strang als Matrize dient, (3) und Verknüpfung mit dem übrigen DNA-Strang (4). Das bedeutet die Übernahme der Information eines Einzelstranges. Je nach dem, ob der Wildtyp- oder der Mutantenstrang korrigiert wird, entsteht ein Homoduplexmolekül entweder mit Mutanten- (Abb. 9, I) oder mit Wildtypgenotyp (Abb. 9, II). In gleicher Weise erfolgt Konversion für ein Heteroduplexmolekül mit einem nicht komplementären AC-Basenpaar. Nach Konversion kann entweder ein Homoduplexmolekül mit AT-Basenpaar als Mutantengenotyp oder mit GC-Basenpaar als Wildtypgenotyp entstehen.

Detailliertere Aussagen über die Länge und die Richtung des eliminierten Stranges könnten aus der Untersuchung der Co-Konversion eng benachbarter mehrerer Heteroduplexregionen gewonnen werden. Weiterhin wäre in einem Heteroduplexmolekül für verschiedene Mutanten mit zunehmendem Genabstand ein Gradient der Co-Konversion zu erwarten. Hierzu könnten Heteroduplexmoleküle für mehrere Mutantenallele nach Transfektion mit der Single Burst-Technik untersucht werden. Da verschiedene Kombinationsmöglichkeiten bei unterschiedlichen Konversionsereignissen von mehreren Heteroduplexregionen auftreten, müßte jeder Phagenpartikel in den Einzelwürfen auf seine genetische Konstitution hin untersucht werden. Es werden dann die experimentellen Daten mit den erwarteten Werten, die sich aus den Häufigkeiten der Konversion für Einzelmutanten berechnen lassen, verglichen. Bei Co-Konversion sind die experimentellen Werte für gemeinsame Konversion gegenüber den erwarteten Werten erhöht. Weiterhin kann bevorzugte Richtung der Co-Konversion aus Heteroduplexmolekülen, in denen zwei Mutantenallele verschiedener Konversionsrichtung in trans-Konfiguration angeordnet sind, aus dem überwiegenden Auftreten eines Mutantengenotyps der Doppelmutante bestimmt werden.

Ergebnisse, die aus begonnenen genetischen Untersuchungen von trans-fizierten Heteroduplexmolekülen für amber-Doppelmutanten in trans-Konfiguration gewonnen wurden, deuten auf eine Co-Konversion für Doppelmutanten aus dem Cistron am 102 - am 112. Maximal entsprach das gemeinsam korrigierte Segment in dem Cistron am 102 - am 112 einer Genomlänge von ca. 2×1.1 Rekombinationseinheiten. Hieraus folgt, daß längere Fragmente der DNA bei der Konversion eliminiert werden. Genauere Größenbestimmung gemeinsam korrigierter DNA-Abschnitte wurden bei *B. subtilis* aus der Häufigkeit von Co-Transformanden gewonnen (Bresler et al., 1971). Es wurde eine Größe von ca. $2 \cdot 10^6$ Dalton (ca. 10^4 Nukleotidpaare) bestimmt. Dieser relativ große Abschnitt gemeinsamer Korrektur wird mit der Wirkung einer Exonuklease, die den Heteroduplex-Regionen benachbarten Strangabschnitt mit entfernt, gedeutet.

Es sollen an dieser Stelle die molekularen Einflüsse, die bei der Konversion von Marker-Effekten wirksam sein könnten, diskutiert werden. Es wurde an vier amber-Mutanten Marker-Effekte in der Art beobachtet, daß Konversion in den beiden möglichen Heteroduplexkombinationen stets zum amber-Genotyp erfolgte. Als Erklärung dieser Markereffekte konnte ein Wachstumsvorteil der Mutante über den Wildtyp ausgeschlossen werden (siehe Ergebnisse, Seite 69). Alle isolierten amber-Mutanten waren Einzelmutanten, da sie eine relativ hohe Reversionsrate von 10^{-4} - 10^{-5} hatten. Es war daher weiterhin ausgeschlossen, daß dieser Markereffekt bei der Konversion durch amber-Doppelmutanten verursacht wurde.

Die amber-Mutante am 119 zeigte in ganz anderer Weise ein abweichendes Konversionsverhalten. Ihr Anteil von Mischwürfen lag in reziproken Heteroduplices sehr viel höher als es entsprechend ihrer Position auf der Genkarte erwartet wurde. Für diese Mutante war die Konversionshäufigkeit reduziert.

Für die meisten Deletionsmutanten wurden in den reziproken Heteroduplexkombinationen Konversion fast ausschließlich zum Genotyp der Mutante beobachtet. Weiterhin war die Häufigkeit in den Mischwürfen sehr viel niedriger als sie entsprechend der Position der Mutante auf der Genkarte erwartet wurde (Trautner et al., 1972).

Bei Pilzen sind ebenfalls sehr klar Marker-Effekte für zwei Deletionsmutanten bei *Ascobolus immersus* in dem Gen 75 gezeigt worden (Rossignol, 1969).

Es ist möglich, daß bei Heteroduplexkonversion von amber-Mutanten mit Marker-Effekten eine bestimmte Basenverteilung, die dem nonsense-Triplett benachbart ist, einen Einfluß auf die Erkennung ausüben. Da in einem Cistron bei der Konversion Mutanten mit und ohne Marker-Effekte auftreten, sollten nur wenige benachbarte Basenpaare zu einer veränderten Konfiguration der DNA-Helix führen. Zusätzlich zu dem AT-Basenpaar in dem nonsense-Triplett könnten AT reiche DNA-Abschnitte in der Nähe der Heteroduplexregion einen Effekt auf die Stabilität der Helix ausüben. Als Folge davon sollte eine lokale Trennung der Einzelstränge auftreten. Hiermit ist jedoch noch keine ausreichende Erklärung für die bevorzugte Eliminierung des Wildtypstranges bei Konversion zum Mutantengenotyp gegeben.

Loops in Heteroduplexmolekülen zwischen Wildtyp und Deletionsmutanten, die man sich als einzelsträngigen herausragenden Wildtypstrang vorstellen kann, geben dagegen eine einleuchtende Erklärungsmöglichkeit für Marker-Effekte bei der Konversion der meisten Deletionsmutanten (Trautner et al., 1972). So wird angenommen, daß dieser Loop bei der Konversion eliminiert wird. Als Folge davon erfolgt Konversion zum mutierten Strang. In Deletionsmutanten mit H/H-Konversionsmuster werden dagegen Loops mit veränderter Sekundärstruktur vermutet, so daß diese Deletionsmutanten dem konventionellen Konversionsmuster der Punktmutanten folgen. Wie für verschiedene Deletionsmutanten gezeigt werden konnte, ist die Größe der Deletion nicht der Faktor, der das Konversionsmuster bestimmt.

5. Ausblick

Weitere Untersuchungen, die 1. die Struktur und die Funktion des SPP1-Genoms und 2. die Konversion von SPP1 betreffen, sollten fortgeführt werden. Es sollen zunächst die Fragestellungen zur Struktur und Funktion des SPP1-Genoms betrachtet werden.

Um die Komplementationsuntersuchungen zu ergänzen, müßte die Funktion der Mutanten aus verschiedenen Cistronen charakterisiert werden. Da SPP1 für ca. 35 Proteine codiert (Esche, unveröffentlicht) und 17 Cistrone definiert sind, existieren auf dem SPP1-Genom sicherlich noch weitere Gene mit verschiedenen Funktionen. Es sollten daher weitere Punktmutanten isoliert und in die Genkarte von SPP1 eingeordnet werden.

In Ergänzung zur genetischen Charakterisierung sollte das abweichende Rekombinationsverhalten von ts 40 näher in Mehr-Faktorkreuzungen untersucht werden. Ebenso müßte die physikalische Länge der Genkarte von SPP1 bestimmt werden. Hierfür sollten definierte Segmente des SPP1-Genoms hergestellt werden, die im Transfektionssystem mit der Marker-Rescue-Methode untersucht werden müßten. Im nächsten Abschnitt soll auf die weiteren Untersuchungen zur Konversion eingegangen werden.

Es müßten die begonnenen Untersuchungen der Co-Konversion von Heteroduplexmolekülen für Doppelmutanten fortgesetzt werden. Da Konversion von den Mutanten abhängig ist, ist zu erwarten, daß Konversion von Heteroduplexmolekülen für Doppelmutanten eine Funktion des Konversionsverhaltens (Häufigkeit und Richtung der Konversion) der Einzelmutanten, ihrer Interaktionen und des physikalischen Abstandes zwischen den beiden Mutationen ist. Daher sollten Heteroduplexmoleküle für Mutantenallele, die verschiedene Konversionsmuster zeigen, aus gemeinsamen und getrennten Cistronen untersucht werden. Hieraus könnte die Länge und die Richtung gemeinsam konvertierter DNA-Abschnitte ermittelt werden. Wenn die Korrelation zwischen Genkarte und physikalischem Molekül von SPP1 bekannt wäre, könnte

die physikalische Länge von gemeinsam konvertierten Genabschnitten ermittelt werden. Um Näheres über die Eigenschaften der Marker-Effekte bei der Konversion zu erfahren, könnten außerdem aus Heteroduplexkombinationen von Doppelmутanten mit und ohne Marker-Effekt bei der Konversion weitere Aussagen gewonnen werden. Um Untersuchungen dieser Art durchführen zu können, müßten die Häufigkeiten aller möglichen Konversionsereignisse, die an beiden Heteroduplexregionen erfolgen könnten, genetisch bestimmt werden. Bisher sind die bei der Konversion beteiligten Enzyme nicht genauer bekannt. Bei der Transformation von *B. subtilis* wurde ebenfalls Konversion beobachtet (Bresler et al., 1968 und 1971). Es ist daher wahrscheinlich, daß dieselben Konversionsenzyme für die Konversion bei der Transformation von *B. subtilis* und bei der Transfektion von Heteroduplices des Phagen SPP1 verantwortlich sind. Die einzelnen enzymatischen Prozesse bei der Konversion könnten demnach mit verschiedenen Mutanten von *B. subtilis* an dem veränderten Konversionsverhalten von Heteroduplices studiert werden. Offenbar erfolgt Konversion von Heteroduplices unabhängig von dem Enzymsystem der UV-Reparatur und der Rekombination. Auf *B. subtilis*-Stämmen, die in *rec1* oder *rec2* mutiert waren oder *hcr* defekt waren, zeigten Heteroduplices für SPP1 kein verändertes Konversionsverhalten (Spatz und Trautner, 1970). Weiterhin hatte weder UV-Strahlung von kompetenten Zellen noch von Heteroduplex-DNA einen Einfluß auf die Konversion von SPP1 (Spatz und Trautner, 1970). Ebenfalls führten UV bestrahlte kompetente Zellen von *E. coli* zu keinem Unterschied in dem Ausmaß der Konversion von λ (Doerfler und Hogness, 1968). Andererseits wurde mit hohen UV-Dosen bei *B. subtilis* die Konversion in der Transformation gehemmt (Bresler et al., 1971).

Bisher wurden Konversionsenzyme allein aus genetischen Daten abgeleitet. Um den direkten Beweis für die Wirkung spezifischer Enzyme bei der Konversion zeigen zu können, müßten die Konversionsenzyme isoliert und charakterisiert werden. Es könnten dann Mutanten, die Konversionsdetekte aufweisen, auf ihre fehlenden Enzymfunktionen hin untersucht werden.

Weiterhin müßten die Konversionsenzyme in vitro an Heteroduplexstrukturen auf Konversion untersucht werden. In diesem zellfreien System könnte dann auch geklärt werden, ob ein Zusammenhang zwischen Konversion und Transkription besteht.

6. Zusammenfassung

Es wurden 25 suppressor-sensitive Mutanten (amber-Mutanten) des *B. subtilis* Phagen SPPI isoliert und durch Komplementation Cistronen zugeordnet, sowie durch Bestimmung der Prozentsätze an Wildtyprekombinanten aus Zweifaktorkreuzungen in einer linearen Genkarte angeordnet.

Weiterhin wurden für 21 Mutanten Heteroduplexmoleküle aus komplementären Strängen, die mit Mutanten- (amber bzw. temperatur-sensitiver Genotyp) und Wildtypallel markiert waren, nach Transfektion mit der Single Burst-Technik genetisch analysiert. Hieraus wurde das Konversionsverhalten bestimmt.

Es wurden folgende Ergebnisse erhalten:

- 1) Die isolierten amber-Mutanten lassen sich in 9 Cistronen einordnen.
- 2) Für das SPPI-Genom wird aus der Gesamtzahl von SPPI-Mutanten eine Länge der Genkarte von 2×49 Rekombinations-einheiten ermittelt.
- 3) In der überwiegenden Zahl von Heteroduplexkombinationen erfolgt Konversion zum Genotyp des schweren Stranges.
- 4) Es werden bei Konversion mit Sicherheit bei einer amber-Mutante und möglicherweise auch bei drei anderen amber-Mutanten "Marker-Effekte" beobachtet. Unabhängig von der Orientierung von amber- und Wildtypallelen in Hinblick auf die komplementären Stränge erfolgt in beiden möglichen Heteroduplexkombinationen Konversion überwiegend zum Genotyp der amber-Mutante.
- 5) Es werden diskrete Regionen des SPPI-Genoms beobachtet, in denen Konversion entweder überwiegend zum Genotyp des schweren oder des leichten Stranges eines Heteroduplex erfolgt.

- 6) Die Korrelation zwischen der Effizienz der Konversion und der Genkarte bestätigt die Replikationsrichtung von links nach rechts aus unabhängigen Befunden (Klotz, 1973). Möglicherweise läuft die Replikation nicht nur in einer Richtung, sondern bidirektional.
- 7) In der Abhängigkeit zwischen Effizienz der Konversion und der Position der Mutante auf der Genkarte zeigte eine amber-Mutante einen "Marker-Effekt". Entgegen ihrer Position wurde für diese Mutante geringere Konversionseffizienz beobachtet.

Aus der hohen Effizienz und der Spezifität der Konversion kann geschlossen werden, daß Konversion als Folge von Heteroduplexerkennung entsprechend dem Holliday-Whitehouse-Modell entsteht.

7. Literatur

- Amati, P., Meselson, M.: Localized negative interference in bacteriophage λ .
Genetics 51, 369-379 (1965)
- Baas, P.D., Jansz, H.S.: Asymmetric information transfer during $\emptyset$ x 174 DNA replication.
J. Mol. Biol. 63, 557-568 (1972)
- Benzer, S.: On the topography of the genetic fine structure.
Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) 47, 403-426 (1961)
- Biswal, N., Kleinschmidt, A.K., Spatz, H. Ch., Trautner, I.A.:
Physical properties of the DNA of bacteriophage SP50.
Molec. Gen. Genet. 100, 39-55 (1967)
- Boon, T., Zinder, N.D.: A mechanism for genetic recombination generating one parent and one recombinant.
Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) 64, 573-577 (1969)
- Bresler, S.W., Kreneva, R.A., Kushev, V.V.: Correction of molecular heterozygotes in the course of transformation.
Molec. Gen. Genet. 102, 257-268 (1968)
- Bresler, S.W., Kreneva, R.A., Kushev, V.V.: Molecular heterozygotes in *Bacillus subtilis* and their correction.
Molec. Gen. Genet. 113, 204-213 (1971)
- Chase, M., Doermann, A.H.: High negative interference over short segments of the genetic structure of bacteriophage T4.
Genetics 43, 332-353 (1958)
- Dressler, D., Wolfson, J., Magazin, M.: Initiation and reinitiation of DNA synthesis during replication of bacteriophage λ .
Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) 69, 998-1002 (1972)

- Drexler, H.: Transduction of gal^+ by coliphage T1. II. Role of π transcription control in the efficiency of transduction. J. of Virology 9, 280-285 (1972)
- Doerfler, W., Hogness, D.S.: Gene orientation in bacteriophage lambda as determined from the genetic activities of hetero-duplex DNA formed in vitro. J. Mol. Biol. 33, 661-678 (1968)
- Georgopoulos, C.P.: Suppressor System in *B. subtilis* 168. J. Bact. 97, 1397-1402 (1969)
- Green, D.M.: Intracellular inactivation of infective SP82 bacteriophage DNA. J. Mol. Biol. 22, 1-13 (1966)
- Green, D.M., Urban, M.J.: Recombination and transfection mapping of cistron 5 of bacteriophage SP82G. Genetics 70, 187-203 (1972)
- Helling, R.B.: The effect of arabinose-specific enzyme synthesis on recombination in the arabinose genes of *E. coli*. Genetics 57, 665-675 (1967)
- Hershey, A., Chase, M.: Genetic recombination and heterozygosis in bacteriophage. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 16, 471-479 (1951)
- Hohlfeld, R., Vielmetter, W.: Bidirectional growth of the *E. coli* chromosome. Nature New Biol. 242, 130-137 (1973)
- Holliday, R.: A mechanism for gene conversion in fungi. Genet. Res. 5, 282-304 (1964)
- Holliday, R.: Genetic recombination in fungi. In: Replication and recombination of genetic material (ed. W.J. Peacock and R.D.Brock), 157-174, Canberra: Australian Academy of Science (1968)

Howard-Flanders, P.: DNA repair.

Ann. Rev. Biochem. 37, 175-200 (1968)

Inman, R.B., Schnös, M.: Structure of branch points in replicating DNA:
Presence of single-stranded connection in λ DNA branch points.

J. Mol. Biol. 56, 319-325 (1971)

Kellenberger, G., Zichichi, M.L., Epstein, H.T.: Heterozygosis and
recombination of bacteriophage λ .

Virology 17, 44-55 (1962)

Kemper, B.: Increased recombinant frequencies with an amber mutation
in the gal-operon of E. coli.

Mol. Gen. Genet. 107, 107-113 (1970)

Klingmüller, W.: Genkonversion. Naturwissenschaften 60, 71-77 (1973)

Klotz, G.: Direction of SPP1 DNA replication in transfected B. subtilis
cells. Molec. Gen. Genet. 120, 95-100 (1973)

Levinthal, C.: Bacteriophage genetics. In: "The Viruses" (F.M. Burnet and
W.M. Stanley, eds.), Vol. II, p. 281. Academic Press, New York (1959)

Lindegren, C.C.: Gene conversion in Saccharomyces. J. Genet. 51, 625-637 (1953)

Masters, M., Broda, P.: Evidence for the bidirectional replication of the
E. coli chromosome. Nature New Biol. 232, 137-140 (1971)

Michalke, W.: Erhöhte Rekombinationshäufigkeit an den Enden des T1-
Chromosoms. Molec. Gen. Genet. 99, 12-33 (1967)

Mosig, G. et al.: The pattern of recombination and segregation in terminal
regions of T4 DNA molecules.

Molec. Gen. Genet. 113, 51-91 (1971)

Norkin, L.C.: Marker-specific effects in genetic recombination.

J. Mol. Biol. 51, 633-655 (1970)

- Olive, L.S.: Aberrant tetrads in *Sordaria fimicola*.
Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) 45, 727-732 (1959)
- Riva, S., Posinelli, M., Falaschi, A.: A new phage of *Bacillus subtilis* with infectious DNA having separable strands.
J. Mol. Biol. 35, 347-356 (1968)
- Røger, M.: Evidence for conversion of heteroduplex transforming DNAs to homoduplexes by recipient pneumococcal cells.
Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) 62, 466-470 (1972)
- Rossignol, J.-L.: Existence of homogeneous categories of mutants exhibiting various conversion patterns in gene 75 of *Ascobolus immersus*.
Genetics 63, 795-805 (1969)
- Rottländer, E., Trautner, T.A.: Genetic and transfection studies with *B. subtilis* phage SP50. I. Phage mutants with restricted growth on *B. subtilis* strain 168. Molec. Gen. Genet. 108, 47-60 (1970)
- Spatz, H. Ch., Trautner, T.A.: One way to do experiments on gene conversion? Molec. Gen. Genet. 109, 84-106 (1970)
- Spatz, H. Ch., Trautner, T.A.: The role of recombination in transfection of *B. subtilis*. Molec. Gen. Genet. 113, 174-190 (1971)
- Spizizen, J.: Transformation of biochemically deficient strains of *Bacillus subtilis* by deoxyribonucleate.
Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) 44, 1072-1078 (1958)
- Studier, F.W.: Bacteriophage T7.
Science 176, 367-357 (1972)
- Tessman, J.: Mutagenic treatment of double- and single-stranded DNA phages T4 and S13 with hydroxylamine.
Virology 35, 331-333 (1968)
- Trautner, T.A.: Untersuchungen an Heterozygoten des Phagen T1.
Z. Vererbungs. 89, 264-271 (1958)

- Trautner, T.A. et al.: Exchange between complementary strands of DNA?
Advances in the Biosciences, Vol. 8, 79-87, Braunschweig: Vieweg (1972)
- Visconti, U., Delbrück, M.: The mechanism of genetic recombination in
phage.
Genetics 38, 5-33 (1953)
- Wake, R.G.: Visualization of reinitiated chromosomes in *Bacillus*
subtilis.
J. Mol. Biol. 68, 501-509 (1972)
- Whitehouse, H.L.K.: The mechanism of genetic recombination.
Biol. Rev. 45, 265-315 (1970)
- Womack, F.C.: An analysis of single-burst progeny of bacteria singly
infected with a bacteriophage heterozygote.
Virology 21, 232-241 (1963)

Lebenslauf

Am 13. November 1944 wurde ich in Sagan (Schlesien) geboren.

Nach 13-jährigem Schulbesuch legte ich 1964 an einem neusprachlichen Gymnasium in Berlin eine Reifeprüfung ab. Anschließend studierte ich in Berlin und ein Semester in Hamburg Biologie mit dem Hauptfach Zoologie und drei Semester Geographie. Im Wintersemester 1966/67 legte ich die Vordiplomprüfung in Biologie ab. Schließlich schloß ich im Sommersemester 1970 das Studium mit der Diplomhauptprüfung ab. In meiner Diplomarbeit, die an dem Zoologischen Institut an der Freien Universität Berlin angefertigt wurde, befaßte ich mich mit der Feinstruktur eines segmentalen Arthropodenorgans.

Im Herbst 1970 begann ich meine Dissertationsarbeit bei Herrn Prof. Dr. T. A. Trautner am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik.

